

# NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

**UMI<sup>®</sup>**

Université de Sherbrooke

**RÉGULATION DE LA PROLIFÉRATION ET DE LA DIFFÉRENCIATION  
DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES PAR LES CASCADES  
MEK/ERK ET AMP<sub>c</sub>/PKA**

Par  
Marie-Josée Boucher  
Département d'Anatomie et Biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
En vue de l'obtention du grade de  
Philosophiae doctor (Ph.D) en Biologie cellulaire

9 Février 2004



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 0-612-94925-7*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 0-612-94925-7*

The author has granted a non-exclusive license allowing the Library and Archives Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

**Canada**

## TABLE DES MATIÈRES

<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>II</b>
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>XII</b>
<b>CHAPITRE I .....</b>	<b>1</b>
<b>1. L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL .....</b>	<b>1</b>
1.1. ARCHITECTURE MATURE DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL; L'AXE CRYPTE-VILLOSITÉ .....	1
1.1.1. Maintien de l'organisation de l'épithélium intestinal.....	3
1.1.1.1. Le cytosquelette.....	4
1.1.1.2. L'adhésion cellule-cellule .....	6
1.1.1.2.1. Les desmosomes.....	7
1.1.1.2.2. Les jonctions adhérentes.....	8
1.1.1.2.2.1. Régulation de l'activité adhésive des jonctions adhérentes.....	11
1.1.1.2.3. Les jonctions serrées.....	14
1.1.1.3. L'adhésion cellule-matrice.....	16
<b>2. PROLIFÉRATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES. 18</b>	
2.1. LE CYCLE CELLULAIRE .....	18



2.2.	LA CASCADE MEK/ERK : UNE VOIE DE SIGNALISATION IMPLIQUÉE DANS LA RÉGULATION DE LA PROLIFÉRATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES .....	26
2.2.1.	Composants et Régulation de la cascade MEK/ERK.....	26
2.2.2.	Régulation du cycle cellulaire par la cascade MEK/ERK .....	33
2.2.3.	La cascade MEK/ERK et la prolifération des cellules épithéliales intestinales .....	36
2.3.	RÉGULATION DE LA PROLIFÉRATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES .....	38
2.3.1.	Rôle des composants luminaux, peptides gastro-intestinaux, cytokines et facteurs Wnt .....	38
2.3.2.	Rôle des jonctions adhérentes .....	40
3.	<b><i>DIFFÉRENCIATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES.....</i></b>	<b><i>41</i></b>
3.1.	MARQUEURS DE DIFFÉRENCIATION DES CELLULES ABSORBANTES .....	41
3.2.	RÉGULATION DE LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES .....	42
3.2.1.	Rôle des composants luminaux et des peptides gastro-intestinaux .....	42
3.2.2.	Rôle des facteurs de transcription cdx1 et cdx2.....	43
3.2.3.	Rôle des jonctions adhérentes .....	44
3.3.	VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUÉES .....	46

3.3.1.	La cascade PI3K et p38 MAPK.....	46
3.3.2.	La cascade MEK/ERK.....	47
3.3.2.1.	<i>Rôles potentiels de la cascade MEK/ERK dans les cellules épithéliales intestinales différenciées.....</i>	49
3.3.3.	La cascade AMPc/PKA.....	51
3.3.3.1.	<i>Composants et Régulation de la cascade AMPc/PKA .....</i>	52
3.3.3.2.	<i>Cascade AMPc/PKA versus différenciation épithéliale intestinale.....</i>	54
<b>4.</b>	<b>HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS .....</b>	<b>55</b>
<b>CHAPITRE II .....</b>		<b>57</b>
<b>1.</b>	<b>DUAL ROLE OF MEK/ERK SIGNALING IN SENESCENCE AND TRANSFORMATION OF INTESTINAL EPITHELIAL CELLS.....</b>	<b>57</b>
	<b>COMPLÉMENT 1 .....</b>	<b>60</b>
<b>2.</b>	<b>REGULATION AND ROLE OF BRUSH BORDER-ASSOCIATED ERK1/2 IN INTESTINAL EPITHELIAL CELLS.....</b>	<b>62</b>
<b>3.</b>	<b>CYCLIC AMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE A NEGATIVELY MODULATES ADHERENS JUNCTION INTEGRITY AND DIFFERENTIATION OF INTESTINAL EPITHELIAL CELLS.....</b>	<b>63</b>

<b>CHAPITRE III .....</b>	<b>65</b>
<b>1. LA CASCADE MEK/ERK EST NÉCESSAIRE MAIS NON SUFFISANTE À LA PROLIFÉRATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES CRYPTALES INTESTINALES.....</b>	<b>65</b>
1.1. UNE ACTIVATION FORTE ET SOUTENUE DE LA CASCADE MEK/ERK ENTRAÎNE LA SÉNESCENCE DES CELLULES ÉPITHÉLIALES CRYPTALES INTESTINALES HUMAINES HIEC.....	67
1.2. UNE ACTIVATION FORTE ET SOUTENUE DE LA CASCADE MEK/ERK INDUIT LA TRANSFORMATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES CRYPTALES INTESTINALES DE RAT IEC-6 .....	77
1.3. RÉGULATION DES ERK ENDOGÈNES PAR LA MEK CA DANS LES CELLULES HIEC ET IEC-6.....	87
<b>2. LA CASCADE MEK/ERK DANS LA BORDURE EN BROSSE DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL PARTICIPE À LA PHYSIOLOGIE DE LA CELLULE ÉPITHÉLIALE INTESTINALE DIFFÉRENCIÉE. ....</b>	<b>98</b>
<b>3. UNE FORTE ACTIVITÉ DE LA CASCADE AMPc/PKA MODULE NÉGATIVEMENT LA DIFFÉRENCIATION ÉPITHÉLIALE INTESTINALE EN PERTURBANT L'ASSEMBLAGE DES JONCTIONS ADHÉRENTES.....</b>	<b>107</b>
<b>4. CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>122</b>
<b>ANNEXE 1.....</b>	<b>123</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>124</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>126</b>

## **LISTE DES ILLUSTRATIONS**

### **CHAPITRE I INTRODUCTION**

FIGURE 1. L'AXE CRYPTÉ-VILLOSITÉ .....	2
FIGURE 2. LA BORDURE EN BROSSE .....	5
FIGURE 3. LA JONCTION ADHÉRENTE FONCTIONNELLE .....	10
FIGURE 4. LA JONCTION SERRÉE.....	15
FIGURE 5. RÉGULATION DE LA PHASE G1 DU CYCLE CELLULAIRE.....	20
FIGURE 6. LA CASCADE Ras/Raf/MEK/ERK .....	27
FIGURE 7. LA CASCADE AMPc/PKA.....	53

### **CHAPITRE II MATÉRIELS/MÉTHODES ET RÉSULTATS**

#### **COMPLÉMENT 1**

FIGURE 1. Effets du PMA et du FBS sur l'activité des ERK1/2 et sur la progression de la phase G1 du cycle cellulaire .....	60
FIGURE 2. Contribution de l'inhibiteur p21 dans la non-atteinte du point de restriction suite à une activation soutenue de la cascade MEK/ERK .....	61

### **CHAPITRE III DISCUSSION**

TABEAU 1. ANALYSE PAR MICROPUCES DES ARNm MODULÉS DANS LES CELLULES IEC-6-MEK CA .....	85
---	----

FIGURE 8. EFFETS DE L'EXPRESSION D'UNE MEK CA DANS LES CELLULES ÉPITHÉLIALES CRYPTALES INTESTINALES. ....	97
FIGURE 9. MODÈLE PROPOSÉ SUR LE RÔLE DE L'ACTIVATION DE LA CASCADE MEK/ERK DANS LA BORDURE EN BROSSE DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL. ....	106
FIGURE 10. MODÈLE PROPOSÉ EXPLIQUANT L'IMPACT NÉGATIF DE LA CASCADE AMP $\alpha$ /PKA SUR LA DIFFÉRENCIATION ENTÉROCYTAIRE. .....	121

## *ANNEXE I*

FIGURE 1. Expression de l'inhibiteur p16 <sup>INK4A</sup> dans l'épithélium intestinal de foetus humain .....	123
--	-----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN :	acide déoxyribonucléique
AMPc :	adénosine monophosphate cyclique
APC :	adenomatous polyposis coli
APO A1 :	apolipoprotéine A1
ARF :	cadre de lecture alternatif (alternative reading frame)
ARNm :	acide ribonucléique messenger
ATP :	adénosine triphosphate
8Br-cAMP :	8-bromo-AMPc
Cip/Kip :	cdk inhibitory protein/kinase inhibitory protein
CNF:	facteur nécrosant cytotoxique (cytotoxic necrotizing factor)
cPLA2:	phospholipase A2 cytosolique
CREB :	protéine liant un élément de réponse à l'AMPc (cAMP-response element binding protein)
EGF :	facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor)
EGTA :	acide éthylèneglycol-bis-( $\beta$ -amino-éthyléther) N,N,N',N' tétraacétique
eIF :	facteur d'initiation de la traduction eukaryote (eukaryotic initiation factor)
EPAC :	protéine d'échange directement activée par l'AMPc (exchanging protein directly activated by cAMP)

ERK :	kinase régul��ris��e par les signaux extracellulaires (extracellular-regulated kinase)
GDP :	guanosine di-phosphate
GLP :	peptide de type glucagon (glucagon-like peptide)
GTP :	guanosine tri-phosphate
hDlg :	homologue humain de Discs large (human Discs large)
HIEC :	cellules épithéliales intestinales humaines (human intestinal epithelial cells)
HMG :	protéine du groupe à haute mobilité (high mobility group protein)
IEC :	cellules épithéliales intestinales (intestinal epithelial cells)
IGF :	facteur de croissance insulinique (insulin-like growth factor)
IL :	interleukine
INK4 :	inhibiteur de cdk4
ITF :	intestinal trefoil factor
JNK :	c-Jun N-terminal kinase
kDa :	kilodalton
KGF :	facteur de croissance des kératinocytes (keratinocyte growth factor)
MAGUK :	guanylate kinase associ��e à la membrane (membrane-associated guanylate kinase homologue)
MAPK :	protéine kinase activée par les mitogènes (mitogen-activated protein kinase)

MAPKK :	protéine kinase de la kinase activée par les mitogènes (mitogen-activated protein kinase kinase)
MDCK :	Madin-Darby canine kidney
MEK :	kinase de la kinase régulée par les signaux extracellulaires (mitogen-extracellular kinase)
MEK CA :	mutant constitutivement actif de la MEK
MEK WT :	MEK sauvage (wild type)
MKP :	MAPK phosphatase
MLCK :	kinase des chaînes légères de myosine (myosin light chain kinase)
PCDE :	culture primaire d'entérocytes différenciés (primary culture of differentiated enterocytes)
PDGF :	facteur de croissance dérivé des plaquettes (platelet-derived growth factor)
PI3K :	phosphatidyl inositol-3 kinase
PKA:	protéine kinase A
PKC :	protéine kinase C
PMA :	phorbol 12-myristate 13-acétate
pRb:	protéine du rétinoblastome
PTP-ER :	protéine tyrosine-phosphatase ER
PYY :	peptide YY
ROCK:	Rho kinase
SOS :	son of sevenless



TGF $\alpha$ :	facteur de croissance transformant alpha (transforming growth factor alpha)
TGF $\beta$ :	facteur de croissance transformant beta (transforming growth factor beta)
TPA :	12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate
VASP :	phospho-protéine stimulée par la vasodilatation (vasodilator-stimulated phosphoprotein)
VIP:	peptide vaso-intestinal (vasointestinal peptide)
ZO:	zonula occludens

## RÉSUMÉ

### RÉGULATION DE LA PROLIFÉRATION ET DE LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES PAR LES CASCADES MEK/ERK ET AMPc/PKA

Par

Marie-Josée Boucher

Département d'Anatomie et Biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine

En vue de l'obtention du grade de

Philosophiae doctor (Ph. D) en Biologie cellulaire

L'épithélium intestinal est caractérisé par son renouvellement rapide et continu nécessitant une coordination parfaite des processus de prolifération, migration et différenciation cellulaire. L'axe crypte-villosité, l'unité fonctionnelle de l'intestin, facilite la synchronisation de ces processus cellulaires. Ainsi, la crypte séquestre les cellules prolifératives alors que la villosité expose les cellules pleinement différenciées à la lumière intestinale. Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui régularisent la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire permettra de mieux saisir comment l'homéostasie tissulaire de l'intestin est préservée et pourquoi une dérégulation de ces mécanismes entraîne certaines pathologies.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons tenté de clarifier l'implication de cascades de signalisation intracellulaires, MEK/ERK et AMPc/PKA, dans la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Dans un premier temps, nous avons montré que la cascade MEK/ERK est nécessaire mais non suffisante à la prolifération des cellules épithéliales intestinales. Entre autres, nos études ont révélé que l'expression d'une forme constitutive active de MEK (MEK CA) menait à deux réponses cellulaires bien distinctes dans des cellules d'origine humaine ou de rat. Dans les cellules humaines HIEC, l'expression d'une MEK CA entraîne un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire et une sénescence prématurée caractérisée par 1- une augmentation de l'expression des protéines p53, p21 et p16<sup>INK4A</sup>, 2- une morphologie particulière des cellules devenue plus étendue, 3- et la détection d'une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence. Dans les cellules de rat IEC-6, l'expression d'une MEK CA promeut la transformation cellulaire. Pour expliquer la prolifération accrue, nous avons montré une augmentation d'expression de la cycline D1, de cdk4, de cdk2, et une diminution de l'expression de l'inhibiteur p27 dans les cellules confluentes IEC-6-MEK CA. De plus, nous avons montré une corrélation entre la prolifération des cellules IEC-6 et l'activité d'un variant d'épissage de ERK1, ERK1b. Comme

l'inhibition de la cascade MEK/ERK bloque la prolifération des cellules épithéliales intestinales, nous en avons conclu que la cascade MEK/ERK est nécessaire à la prolifération de ces cellules mais que seule, une activation soutenue de la cascade MEK/ERK ne permet pas la prolifération cellulaire à moins que des mutations aient entraînées une perte des signaux d'arrêt. Dans ces cas, l'activation de la cascade MEK/ERK peut devenir un dangereux signal mitogénique.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu clarifier le rôle de la cascade MEK/ERK dans la physiologie de la cellule épithéliale intestinale différenciée. Nous avons démontré que les ERK1/2 et ses activateurs potentiels en amont, Ras, p85/PI3K, Rac1, PKC $\alpha$ , MEK, sont présents dans la bordure en brosse de l'épithélium intestinal. De plus, nous avons montré que les ERK présentes dans la bordure en brosse sont activées par divers stimuli tels que l'EGF et la prise de nourriture. Certaines évidences suggèrent que l'actine pourrait être régulée par les ERK1/2 apicales. Finalement, nos résultats suggèrent qu'une certaine activité ERK1/2 est nécessaire au maintien de la morphologie des cellules épithéliales intestinales différenciées puisque l'inhibition de la cascade MEK/ERK par le UO126 altère l'architecture des microvillosités.

La dernière section de cette thèse soutient qu'une activation soutenue de la cascade AMPc/PKA inhibe la différenciation morphologique et fonctionnelle des cellules épithéliales intestinales humaines. Nos résultats suggèrent qu'une activation inappropriée de la cascade AMPc/PKA perturbe l'assemblage des jonctions adhérentes avec le cytosquelette d'actine. De plus, nous présentons certaines évidences que la E-cadhérine pourrait être un substrat de la PKA *in vivo*.

L'analyse des voies de signalisation qui régularisent la prolifération et la différenciation nous a permis de mieux comprendre la physiologie intestinale et les désordres physiologiques pouvant être associés à une dérégulation des voies de signalisation MEK/ERK et AMPc/PKA.

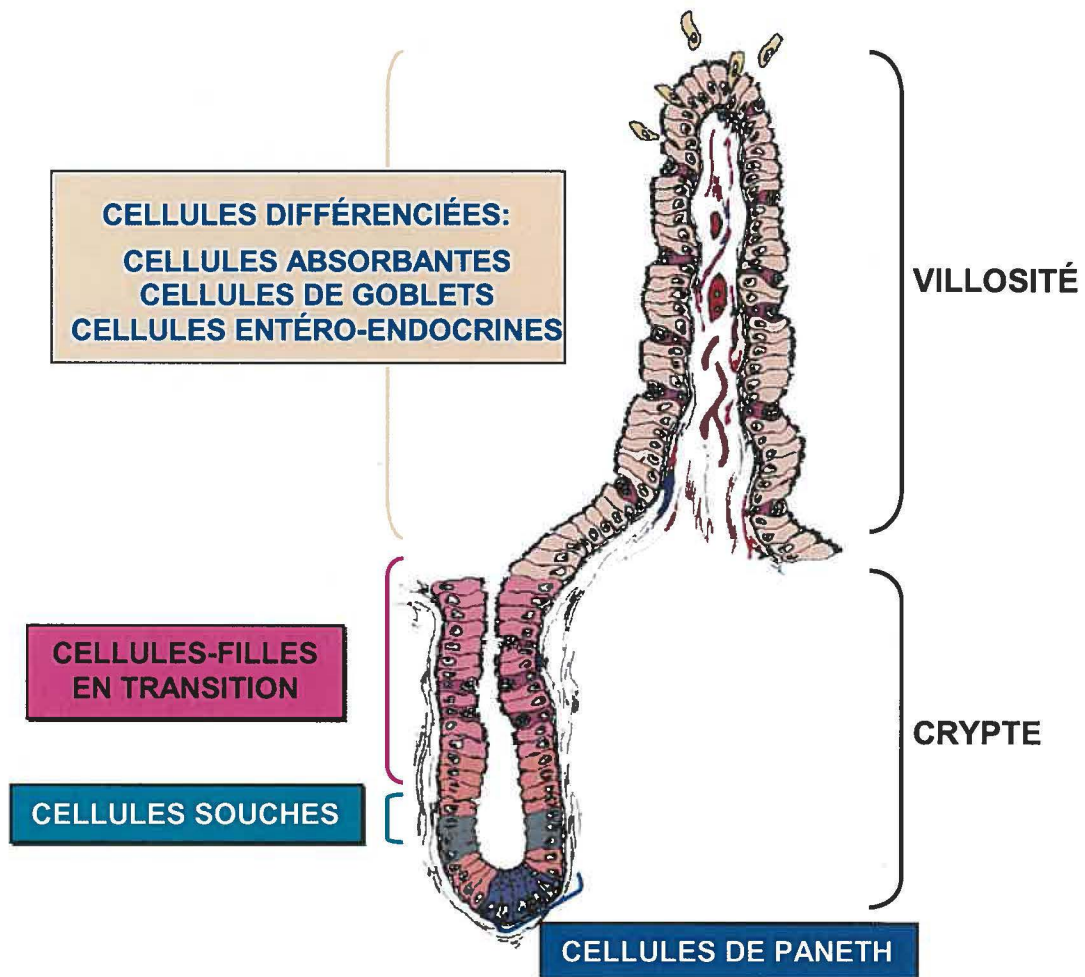
## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1. L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL

##### 1.1. ARCHITECTURE MATURE DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL; L'AXE CRYPTÉ-VILLOSITÉ

L'intestin grêle est l'organe du système digestif qui assure les fonctions essentielles de digestion terminale des aliments et d'absorption des nutriments. Pour pourvoir adéquatement à ses fonctions, l'épithélium intestinal a adopté une architecture bien particulière qui lui permet à la fois d'augmenter sa surface d'absorption et de renouveler continuellement son réseau de cellules absorbantes. Cette architecture bien distincte reflète l'unité fonctionnelle de l'intestin soit l'axe crypte-villosité (Figure 1). Des cellules dites souches sont retrouvées exclusivement à la base des cryptes. De par leur division, elles donnent naissance à des cellules-filles qui, quant à elles, à une exception près, tout en migrant vers le haut de la crypte, se divisent de quatre à six reprises avant de complètement bloquer leur prolifération et d'entamer un processus de différenciation entérocytaire (cellules-filles en transition). Ainsi, tout l'épithélium villositaire est peuplé de cellules pleinement différenciées aptes à remplir leur fonction digestive (Babyatsky et Podolsky, 1999).



**FIGURE 1. L'AXE CRYPTÉ-VILLOSITÉ**

Tiré et modifié de Saxon et al. (1994). Pour détails, voir texte.

Les cellules souches de l'épithélium intestinal sont de nature pluripotente (Babyatsky et Podolsky, 1999; Stappenbeck et al., 1998). En effet, quatre types cellulaires émergent de la division de leurs cellules-filles. Les cellules absorbantes sont de loin le type le plus abondant et le plus important pour la fonction digestive. Elles contribuent directement à la digestion puis à l'absorption des nutriments passant dans la lumière intestinale. Deux autres types cellulaires tapissent l'épithélium intestinal villositaire. Les cellules à mucus ou de Goblets sont responsables de la sécrétion de mucus et du relâchement dans la lumière intestinale d'un peptide stable qui protégerait l'épithélium des blessures éventuelles: l'intestinal trefoil factor (ITF). De plus, diverses cellules entéro-endocrines ont été identifiées de par leur produit de sécrétion. Finalement, contrairement aux autres types cellulaires de l'épithélium intestinal, les cellules-filles qui ont donné naissance aux cellules de Paneth migrent vers le bas et demeurent au fond de la crypte. Même si l'étude à l'aide de souris transgéniques déficientes en cellules de Paneth n'a pas établi de rôle précis pour ce type cellulaire (Garabedian et al., 1997), de par leurs sécrétions d'agents anti-microbiens et de facteurs de croissance, elles pourraient contribuer au système de défense de la muqueuse intestinale (Babyatsky et Podolsky, 1999).

#### **1.1.1. Maintien de l'organisation de l'épithélium intestinal**

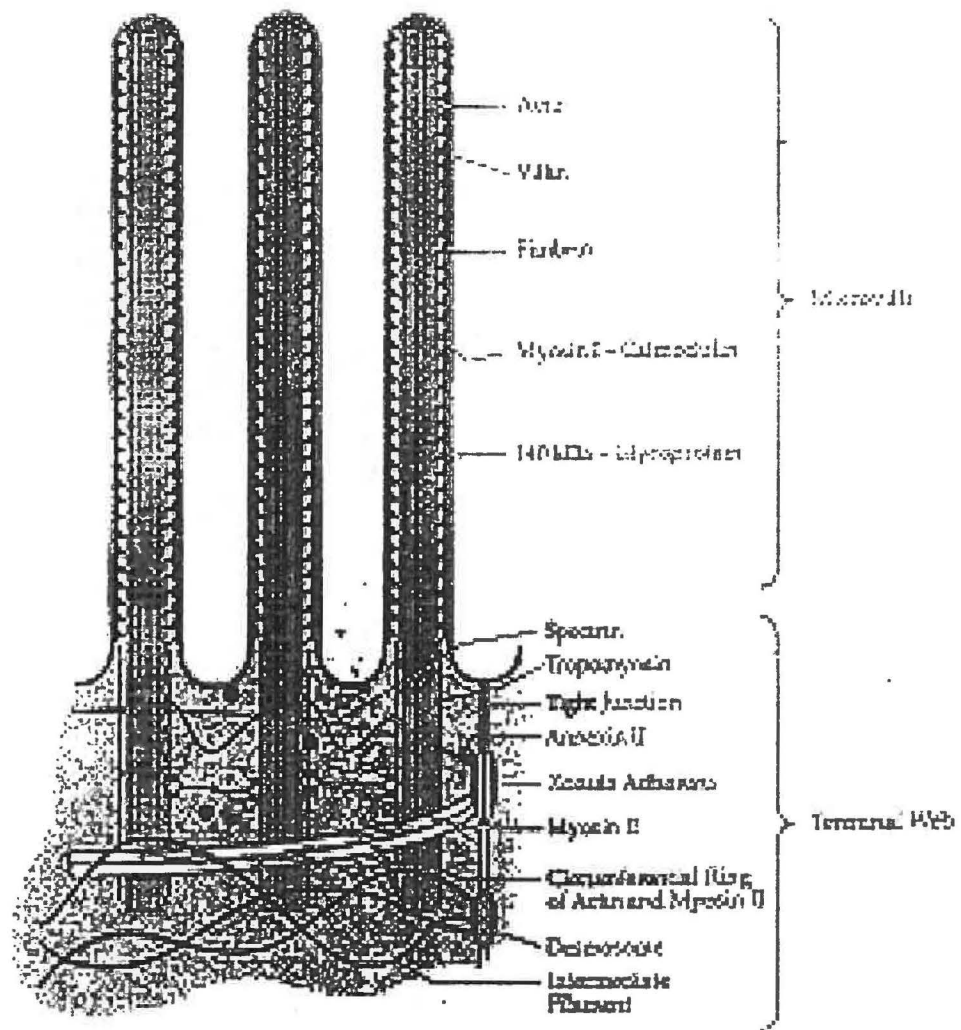
En plus de sa fonction digestive vitale, l'épithélium intestinal, comme tous les épithéliums, assure une fonction primaire essentielle : celui d'agir en

tant que barrière (Madara, 1999). En effet, puisque la lumière intestinale est en contact avec l'environnement externe, la première couche contiguë à la lumière, l'épithélium, se doit de protéger les couches plus profondes contre les assauts externes. Ainsi, les cellules formant l'épithélium se doivent de s'assembler en une couche imperméable. Plusieurs pré-requis sont nécessaires à l'établissement de cette barrière : la stabilisation des cellules par le cytosquelette, l'adhésion cellule-cellule puis la formation de jonctions fonctionnelles, et l'ancrage des cellules à une membrane basale.

#### **1.1.1.1. Le cytosquelette**

Afin de résister à l'environnement turbulent de la lumière intestinale, la structure des cellules épithéliales se doit d'être renforcie, plus spécialement au niveau de l'apex des cellules. C'est ainsi, qu'en plus de jouer un rôle dans l'expansion de la surface d'absorption, les microvillosités et le réseau terminal forment une structure riche en éléments du cytosquelette nécessaire à la stabilisation des cellules épithéliales intestinales : la bordure en brosse (Figure 2).

Chacune des microvillosités est formée de 20 à 30 microfilaments d'actine qui s'étendent de l'extrémité de la microvillosité jusqu'au réseau terminal (Fath et al., 1993). Ces microfilaments d'actine sont maintenus en faisceaux parallèles grâce aux protéines villine et fimbrine alors que la myosine I couplée à quatre molécules de calmoduline permet le rattachement des microfilaments d'actine à la membrane plasmique apicale. L'eitrine peut



**FIGURE 2. LA BORDURE EN BROSSE**  
Tiré de Fath et al., 1993. Pour détails, voir texte.



également jouer ce rôle d'attachement des microfilaments d'actine à la membrane apicale (Louvard et al., 1992).

Le cytosquelette formant le réseau terminal consiste en trois domaines filamenteux orientés perpendiculairement par rapport au réseau cytosquelettique des microvillosités (Louvard et al., 1992). Tout d'abord, des filaments formés de kératine (filaments intermédiaires) sont attachés aux complexes jonctionnels desmosomes. Juste au-dessus, on retrouve un anneau de microfilaments d'actine relié aux jonctions adhérentes par un complexe incluant la vinculine et l' $\alpha$ -actinine. La myosine II ainsi que la tropomyosine sont également retrouvées au niveau de l'anneau d'actine. Finalement, le troisième domaine comprend la base des microvillosités qui s'enracine dans le réseau filamenteux. La villine et la tropomyosine ont été identifiées au niveau de la racine des microvillosités alors que la spectrine et la myosine II permettraient d'établir un lien entre les différentes racines des microvillosités avoisinantes formant ainsi un treillis filamenteux. Il est à noter que la caldesmone (Rochette-Egly et Haffen, 1987), la cortactine (Wu et Montone, 1998) et l'annexine II (Louvard et al., 1992) sont d'autres protéines liant l'actine déjà identifiées au niveau du réseau terminal de l'épithélium intestinal.

#### **1.1.1.2. L'adhésion cellule-cellule**

L'adhésion entre les différentes cellules formant l'épithélium est évidemment essentielle pour garantir l'étanchéité de la monocouche

épithéliale. Les jonctions cellule-cellule garantissent, entre autres, un rôle structural en maintenant accolées les différentes cellules de l'épithélium. Au niveau de la cellule épithéliale, on retrouve différents types de jonctions spécialisées qui régularisent l'adhésion intercellulaire : les desmosomes, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées. Toutes ces jonctions forment des complexes protéiques construits selon un même et unique schéma : un récepteur adhésif transmembranaire interagit avec le cytosquelette de la cellule via un complexe formé de plusieurs protéines.

#### *1.1.1.2.1. Les desmosomes*

Les desmosomes sont des points de contact cellule-cellule se retrouvant tout le long de la surface latérale des cellules. Desmoglérine et desmocollérine, membres de la famille des cadhérines, sont les récepteurs adhésifs de ce type de jonction (Gumbiner, 1996). La plaque cytoplasmique à laquelle ils sont reliés est principalement constituée de plakoglobine, une protéine similaire à la  $\beta$ -caténine. Ainsi, la structure des desmosomes ressemble beaucoup à celle des jonctions adhérentes décrites ci-dessous à l'exception que la plaque cytoplasmique unit la jonction au cytosquelette formé de filaments intermédiaires et non au cytosquelette d'actine (Gumbiner, 1996).

### 1.1.1.2.2. Les jonctions adhérentes

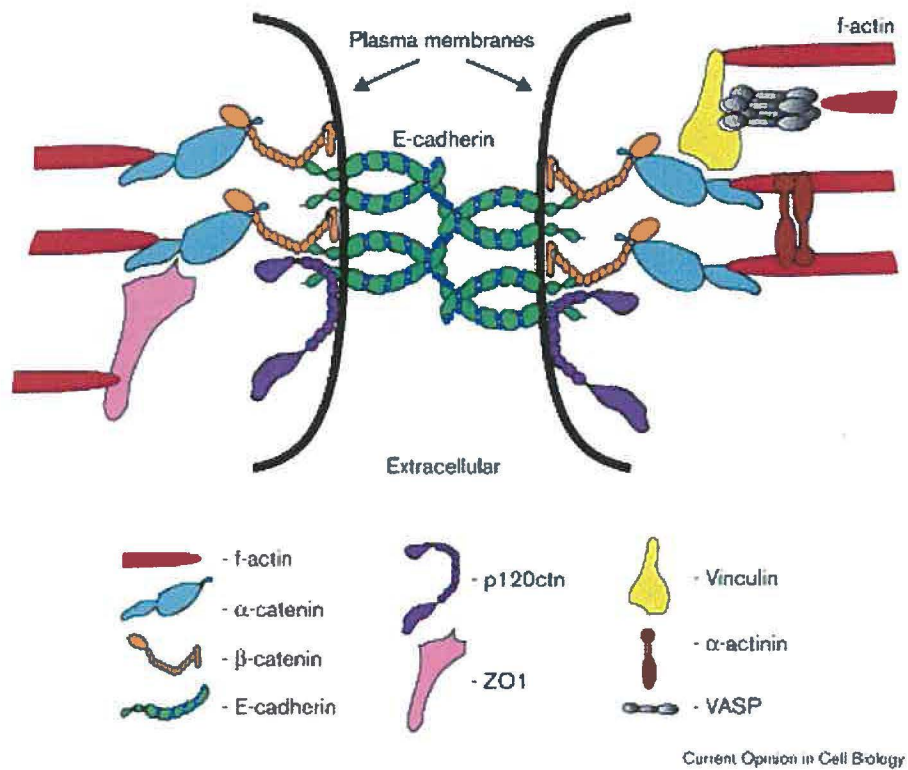
Des études antérieures ont démontré sans équivoque le rôle primordial que jouent les jonctions adhérentes dans le maintien de l'intégrité de la monocouche épithéliale. En effet, chez l'embryon de *Xenopus*, l'expression d'un mutant à activité dominante négative du récepteur adhésif des jonctions adhérentes, la E-cadhérine, détruit l'adhésion cellulaire et la morphogenèse des tissus (Dufour et al., 1994; Levine et al., 1994; Kinter, 1992). Chez l'embryon de souris dont le gène de la E-cadhérine a été invalidé, l'épithélium trophoectodermique est incapable de se former (Larue et al., 1994). De plus, en utilisant différents modèles cellulaires, il a été montré que l'abolition de l'adhésion cellulaire médiée par la E-cadhérine pouvait mener à la dissociation de la monocouche épithéliale (Behrens et al., 1985; Gumbiner et Simons, 1986). À l'inverse, l'expression de la E-cadhérine dans des fibroblastes, cellules qui ne possèdent pas de propriétés adhésives dépendantes du calcium, résulte en la formation d'agrégats compacts similaires à ceux formés par les cellules d'origine épithéliale (Nagafuchi et al., 1987).

Au niveau de l'épithélium intestinal, l'apport fondamental des jonctions adhérentes dans le maintien de la barrière épithéliale a également été confirmé. Effectivement, l'expression restreinte d'un mutant à activité dominante négative de la N-cadhérine dans les villosités de l'intestin de souris perturbe l'adhésion cellule-cellule, visualisée par la présence de trous entre les entérocytes, rompant ainsi l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale

(Hermiston et Gordon, 1995a). La présence de bactéries s'infiltrant entre les entérocytes peu adhérents et l'augmentation locale du nombre de lymphocytes présents dans la lamina propria témoignent de cette perte d'intégrité de l'épithélium (Hermiston et Gordon, 1995a).

Pour remplir adéquatement son rôle dans le maintien de l'intégrité de la monocouche épithéliale, le complexe constituant les jonctions adhérentes se doit d'être correctement assemblé. C'est au niveau des membranes latérales, près de la surface apicale des cellules, que le récepteur transmembranaire prototype des jonctions adhérentes épithéliales, la E-cadhérine, se localise. Le domaine extracellulaire de la E-cadhérine permet des interactions homotypiques, dépendantes du calcium, avec d'autres récepteurs E-cadhérine situés à la surface des cellules voisines (Gumbiner, 1996; Vasioukhin et Fuchs, 2001). La présence de calcium extracellulaire est indispensable à la fonction adhésive de la E-cadhérine puisque le retrait du calcium du milieu entraîne une perte complète de l'adhésion cellule-cellule (Laprise et al., 2002; Lodish et al., 2001; Volberg et al., 1986). Quant au domaine cytoplasmique de la E-cadhérine, il est tout aussi essentiel de par son association avec d'autres protéines cytoplasmiques permettant ainsi l'établissement d'une jonction fonctionnelle (Figure 3).

Près de son domaine transmembranaire, la E-cadhérine interagit directement avec la p120caténine. Le rôle de cette caténine est peu connu, mais elle serait impliquée à la fois dans l'adhésion intercellulaire et dans la migration cellulaire (Vasioukhin et Fuchs, 2001). La formation d'une jonction



**FIGURE 3. LA JONCTION ADHÉRENTE FONCTIONNELLE**  
 Tiré de Vasioukhin et Fuchs, 2001. Pour détails, voir texte.

adhérente fonctionnelle implique la liaison de la E-cadhérine avec une autre caténine, la  $\beta$ -caténine. L'habileté de cette dernière d'interagir avec l' $\alpha$ -caténine assure le lien de la jonction adhérente avec le cytosquelette d'actine. En effet, l' $\alpha$ -caténine est la seule caténine à lier directement les filaments d'actine ce qui en fait une protéine régulatrice importante de l'adhésion cellule-cellule. En plus de son association directe avec l'actine, l' $\alpha$ -caténine est capable de lier d'autres protéines interagissant elles aussi avec l'actine. Entre autres, l' $\alpha$ -actinine, une protéine reliant les microfilaments d'actine entre eux, co-immunoprécipite avec l' $\alpha$ -caténine. Il a également été montré que la localisation de la vinculine et des protéines VASP et Mena aux sites de contact cellule-cellule était dépendante de la présence d' $\alpha$ -caténine. La vinculine est une protéine capable de lier l'actine alors que les protéines VASP et Mena ont un pouvoir de promotion de polymérisation de l'actine. Cela suggère que l' $\alpha$ -caténine non seulement relie le complexe E-cadhérine- $\beta$ -caténine à l'actine, mais permet également l'organisation d'un complexe multiprotéique assurant la régulation du cytosquelette d'actine au niveau de la jonction adhérente (Vasioukhin et Fuchs, 2001).

#### 1.1.1.2.2.1. Régulation de l'activité adhésive des jonctions adhérentes

Au cours du développement puis dans le cadre du maintien de l'homéostasie, les interactions intercellulaires demeurent dynamiques et régulées. En effet, que ce soit lors de l'initiation de la différenciation ou en réponse à des facteurs de croissance ou autres signaux, la force de

l'adhésion intercellulaire fluctue. De plus, la demi-vie de la E-cadhérine étant de 5 à 10 heures dans les cellules épithéliales confluentes (McCrea et Gumbiner, 1991; Shore et Nelson, 1991), cela rend les jonctions adhérentes susceptibles à des variations dans leur force d'adhésion. Il a récemment été proposé que les mécanismes de régulation de l'adhésion rapportés jusqu'à présent pouvaient être regroupés en trois catégories : changements dans la composition du complexe jonctionnel, changements dans l'état de phosphorylation de composants du complexe et changements dans l'interaction du complexe avec le cytosquelette (Gumbiner, 2000).

Évidemment, le niveau d'expression de la E-cadhérine peut influencer la force d'adhésion (Steinberg et Takeichi, 1994). De plus, dans certains types cellulaires, il a été suggéré que la voie de signalisation Wnt, qui mène à une augmentation d'expression de la  $\beta$ -caténine, augmente l'activité adhésive de la E-cadhérine (Bradley et al. 1993; Hinck et al., 1994). Dans d'autres cellules, l'absence d' $\alpha$ -caténine, malgré la présence de complexes E-cadhérine- $\beta$ -caténine, corrèle avec une adhésion cellule-cellule déficiente (Shimoyama et al., 1992; Watabe et al., 1994). La présence et l'activité de la vinculine et des protéines VASP et Mena dans le complexe jonctionnel, en association avec l' $\alpha$ -caténine, pourraient aussi être très importantes. Dans les cellules épithéliales, il semble que la vinculine participe à l'organisation des jonctions adhérentes (Watabe-Uchida et al., 1998). Quant à VASP, il a été montré dans les kératinocytes que l'expression d'un mutant à activité

dominante négative de VASP interfère avec la formation des jonctions adhérentes (Vasioukhin et al., 2000).

La phosphorylation de certains composants du complexe jonctionnel pourrait également moduler l'activité adhésive de la jonction adhérente. Certaines indications appuient cette hypothèse. La phosphorylation sur tyrosine de la E-cadhérine et/ou de la  $\beta$ -caténine corrèle avec une perte d'adhésion dépendante des cadhérines (Daniel et Reynolds, 1997). Certains récepteurs de type tyrosine-kinase ou tyrosine-phosphatase peuvent co-immunoprécipiter avec le complexe cadhérine-caténine (Brady-Kalnay et al., 1995; Hoschuetzky et al., 1994; Pece et Gutkind, 2000). Dans les cellules Colo205 qui possèdent un complexe E-cadhérine-caténine intact mais non-fonctionnel, l'adhésion peut être activée par un traitement avec l'inhibiteur de sérine/thréonine kinases, la staurosporine (Aono et al., 1999). Finalement, une phosphorylation directe de la E-cadhérine par la caséine kinase II, qui corrèle avec une stabilisation de la jonction adhérente, a été rapporté dans les kératinocytes (Serres et al., 2000). Malgré ces données, les mécanismes exacts par lesquels la phosphorylation influence la stabilité de la jonction adhérente demeurent peu connus.

La famille des petites protéines G formée de Rac, Rho et Cdc42 influencerait aussi l'adhésion dépendante des cadhérines. En ce sens, la microinjection d'un mutant à activité dominante négative de Rac1 ou de la toxine C3, une toxine qui inactive Rho, inhibe la formation des jonctions adhérentes dans les kératinocytes (Braga et al., 1997). À l'inverse,

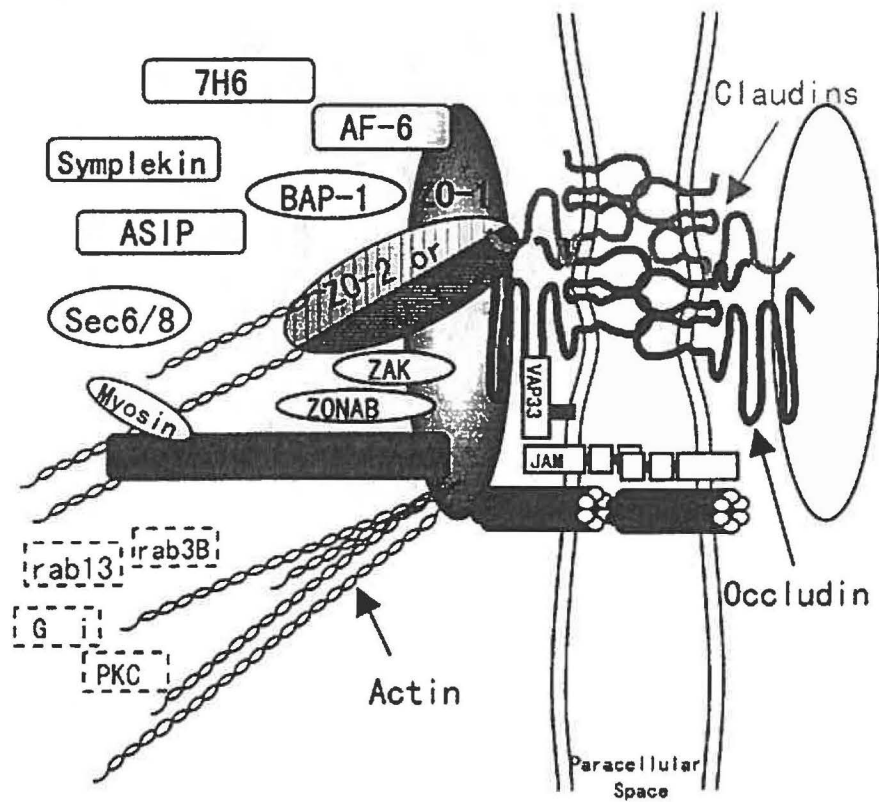


l'expression d'une forme constitutive active de Rac1 ou de Cdc42 dans les cellules MDCK favorise l'accumulation de E-cadhérine, de  $\beta$ -caténine et d'actine aux sites de contact cellule-cellule (Kodama et al., 1999; Takaishi et al., 1997). De plus, le facteur d'échange GDP-GTP pour Rac1, Tiam1, augmente l'activité adhésive de la E-cadhérine (Hordjik et al., 1997). La famille de protéines Rac, Rho et Cdc42 est bien connue pour ses rôles dans la régulation du cytosquelette d'actine (Hall, 1998). Cependant, hormis ce rôle, Rac1 et Cdc42 pourraient aussi influencer les jonctions de par l'inhibition d'une protéine nommée IQGAP1. En effet, cette protéine, de par sa capacité à lier la  $\beta$ -caténine, empêche l'interaction de celle-ci à l' $\alpha$ -caténine et bloque ainsi la liaison de la jonction au cytosquelette d'actine. L'activité de Rac1 et de Cdc42 viendrait inhiber l'IQGAP1 permettant à l' $\alpha$ -caténine de reprendre sa place et de rétablir l'intégrité de la jonction adhérente (Kuroda et al., 1998).

Finalement, de récentes expériences génétiques ont révélé l'existence d'un autre groupe de protéines, incluant Bazooka, Discs lost, Crumbs et Discs large (Dlg), qui participerait à la polarisation et à la biogenèse des jonctions adhérentes dans les cellules d'origine épithéliale chez la drosophile et *Caenorhabditis elegans* (Gumbiner, 2000; Roh et Margolis, 2003; Tepass, 2002).

#### 1.1.1.2.3. Les jonctions serrées

La région la plus apicale où deux cellules voisines se touchent est scellée par les composants des jonctions serrées (Figure 4). Les récepteurs



**FIGURE 4. LA JONCTION SERRÉE**  
Tiré de Mitic et al., 2000. Pour détails, voir texte.

transmembranaires occludine et claudine assurent l'interaction apicale entre les cellules avoisinantes. À l'intérieur de la cellule, ces récepteurs sont associés à une plaque cytoplasmique principalement composée de protéines de la famille des zonula occludens (ZO) : ZO-1, ZO-2, ZO-3 (Mitic et al., 2000). Ces protéines sont membres de la superfamille des guanylate kinases associées à la membrane (MAGUK) et ce sont elles qui vont garantir le relais entre la jonction serrée et le cytosquelette d'actine.

Les jonctions serrées exercent un rôle adhésif dans la monocouche épithéliale. En effet, la transfection de l'occludine dans des fibroblastes déficients dans l'expression de cette protéine médie l'agrégation calcium-indépendante des fibroblastes transfectés (Van Itallie et Anderson, 1997). Cependant, les jonctions serrées remplissent un autre rôle très important. En effet, en restreignant la diffusion paracellulaire, elles s'avèrent essentielles dans le maintien de la fonction barrière de l'épithélium (Balda et Matter, 1998). Ainsi, en scellant l'espace intercellulaire, les jonctions serrées stabilisent la monocouche épithéliale (Madara, 1999).

#### **1.1.1.3. L'adhésion cellule-matrice**

Il semble évident que pour pleinement fonctionner comme barrière, la monocouche épithéliale doit être déposée sur un support. La membrane basilaire sert donc de point d'ancrage des cellules épithéliales permettant la continuité de l'épithélium avec les autres couches cellulaires de l'intestin.

La membrane basale est principalement composée de collagène de type IV, de laminines, d'entactine et de protéoglycans (Beaulieu, 1997). Les cellules épithéliales reconnaissent ces composants de la membrane basale via des récepteurs appelés intégrines et tout comme les récepteurs de l'adhésion cellule-cellule, ces récepteurs de l'adhésion cellule-matrice sont connectés au cytosquelette allouant aux intégrines un rôle structural.

Ce qui s'avère d'autant plus intéressant, est le fait que l'adhésion médiée par les intégrines peut également influencer l'activité adhésive des jonctions adhérentes. En effet, dans les cellules de cancer de colon humain Caco-2, l'activation des intégrines induit une augmentation de la localisation de la E-cadhérine à la membrane en co-localisation avec l'actine renforçant ainsi l'adhésion cellule-cellule (Schreider et al., 2001). De plus, des résultats similaires ont été obtenus dans des cellules humaines de fibrosarcomes HT-1080 (Whittard et Akiyama, 2001a; 2001b). Ainsi, il semblerait que l'adhésion cellule-matrice, en plus de jouer son rôle de soutien, puisse également influencer la force d'adhésion cellule-cellule. Un contrôle de ces deux systèmes d'adhésion paraît donc essentiel pour le maintien de l'intégrité de la monocouche épithéliale.

## **2. PROLIFÉRATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES**

En plus des composants structuraux indispensables pour le maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal, une fine régulation de la prolifération des cellules de la crypte doit exister pour préserver l'homéostasie tissulaire de l'intestin. L'épithélium intestinal étant en perpétuel renouvellement, des divisions cellulaires sous- ou sur-abondantes au niveau de la crypte pourraient avoir des conséquences graves autant sur l'architecture que sur la fonction des villosités.

### **2.1. LE CYCLE CELLULAIRE**

Plusieurs facteurs peuvent influencer la prolifération cellulaire, mais de façon ultime, toutes les voies convergeront vers le cycle cellulaire. C'est effectivement le cycle cellulaire qui contrôle la division d'une cellule en deux cellules-filles.

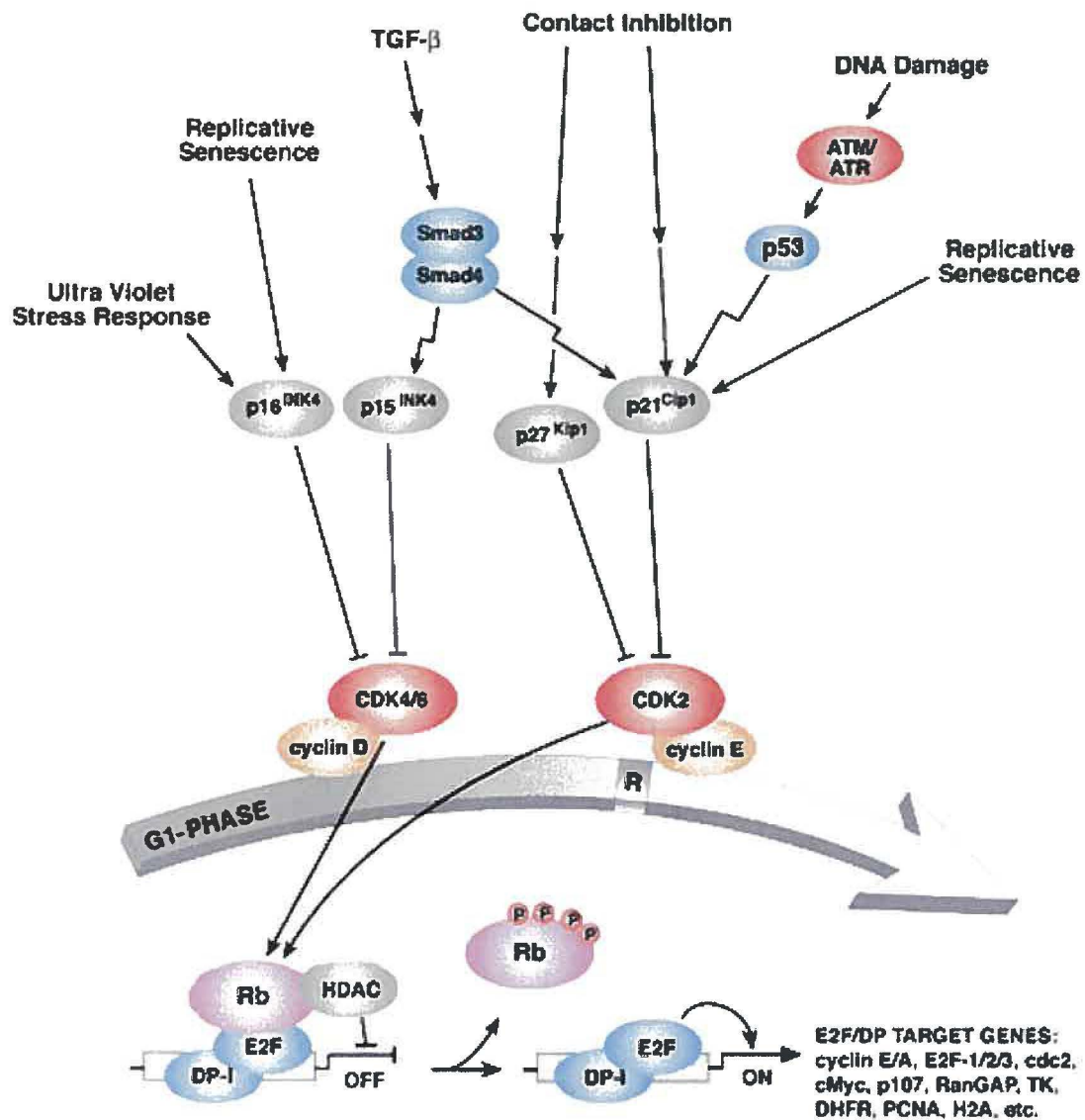
Quatre phases bien distinctes caractérisent le cycle cellulaire. En absence de facteurs mitogéniques, la cellule se retrouve au début de la phase G1 ou encore, si cette condition persiste trop longtemps, elle peut entrer dans un état de quiescence, une phase G0. L'ajout d'un stimulus mitogénique permet à la cellule d'entamer une progression dans la phase G1 du cycle cellulaire où elle double sa masse et duplique son contenu protéique. Ces événements lui permettent de s'engager par la suite dans la phase de synthèse d'ADN, phase S; le contenu en ADN de la cellule passe alors de 2N

à 4N. Un intermède en phase G2 est nécessaire pour s'assurer de la réplication adéquate et complète de l'ADN avant que la cellule donne naissance à deux cellules-filles à contenu 2N à l'issue de la mitose.

La phase la plus longue et la plus hautement régularisée du cycle cellulaire est la phase G1 (Figure 5). L'événement capital de cette phase réside en l'hyperphosphorylation de la protéine du rétinoblastome, pRb, qui coïncide avec l'atteinte du point de restriction ou le point de non-retour. En effet, après avoir passé le point de restriction, la cellule devient indépendante des signaux mitogéniques extérieurs pour poursuivre sa progression en phase S (Pardee, 1989). L'hyperphosphorylation de pRb est un événement obligatoire pour permettre la libération de facteurs de transcription E2F qui, sinon, demeurent inactifs lorsque séquestrés par la forme hypophosphorylée de pRb. Lorsque relâchés, ces facteurs de transcription peuvent alors se lier à leurs éléments de réponse sur l'ADN et participer à la transcription de gènes nécessaires pour la réplication de l'ADN comme la dihydrofolate réductase, la thymidine kinase, la thymidylate synthase et l'histone H2A (Nevins, 1992; Grana et al., 1998).

L'activité de deux complexes enzymatiques participe à l'hyperphosphorylation de pRb (Sherr, 1993). D'abord le complexe cycline D-cdk4/6 puis le complexe cycline E-cdk2 (Lundberg et Weinberg, 1998). Les différents complexes phosphorylant pRb sur différents sites (Connell-Crowley et al., 1997; Zarkowska et Mitnacht, 1997), l'activité des complexes cycline D-

## G1/S Checkpoint



**FIGURE 5. RÉGULATION DE LA PHASE G1 DU CYCLE CELLULAIRE**  
 Tiré et modifié de Cell Signaling Biotechnology ([www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)). Pour détails, voir texte.

cdk4/6 et cycline E-cdk2 est donc nécessaire pour la phosphorylation complète de pRb.

Il n'existe pas que des régulateurs positifs de la progression de la phase G1 du cycle cellulaire. En effet, des inhibiteurs peuvent venir contrecarrer l'activité des complexes cycline-cdk. Ceux-ci sont regroupés en deux familles selon leur mode d'action et leur cible.

Une première famille est constituée de protéines de 15 à 20 kDa qui, de par leur liaison aux cdk4/6, préviennent l'assemblage des complexes cycline D-cdk4/6 et induisent ainsi l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire (Sherr et Roberts, 1995). Cette famille d'inhibiteurs est nommée inhibiteur de cdk4 (INK4) et elle est représentée par quatre membres: p16<sup>INK4A</sup>, p15<sup>INK4B</sup>, p18<sup>INK4C</sup> et p19<sup>INK4D</sup>. Malgré leur fonction commune, le rôle de ces inhibiteurs ne serait pas redondant puisque chacun semble répondre à des signaux anti-prolifératifs distincts. Jusqu'à présent, l'augmentation de l'expression de p16<sup>INK4A</sup> a surtout été associée à la sénescence. En effet, les niveaux d'expression de cet inhibiteur augmentent dramatiquement à mesure que les fibroblastes et cellules épithéliales vieillissent (Alcorta et al., 1996; Hara et al., 1996; Reznikoff et al., 1996). Il a également été suggéré que p16<sup>INK4A</sup> pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'intégrité du génome (Sherr, 1996). Il est à noter que le locus génétique codant pour p16<sup>INK4A</sup> code également pour un autre gène impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire : p19<sup>INK4A/ARF</sup> chez la souris et l'homologue chez l'humain p14<sup>INKA/ARF</sup> (Quelle et al., 1995). p16<sup>INK4A</sup> et p19<sup>INK4A/ARF</sup> partagent deux exons communs en extrémité 3',



cependant p16<sup>INK4A</sup> est codé par l'exon 1 $\alpha$  et p19<sup>INK4A/ARF</sup> par l'exon 1 $\beta$ . Ils possèdent donc leur propre promoteur et ils ne sont pas transcrits selon le même cadre de lecture résultant en deux protéines bien distinctes. Un rôle important attribué à p19<sup>INK4A/ARF</sup> est la stabilisation de p53. En effet, en neutralisant le régulateur négatif de p53, MDM2, p19<sup>INK4A/ARF</sup> stabilise p53 et permet l'induction de gènes sous le contrôle de l'activité transcriptionnelle de p53, comme p21, provoquant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire (Kamijo et al., 1998; Pomerantz et al., 1998; Scott et al., 1998; Quelle et al., 1995; Zhang et al., 1998). La synthèse de p19<sup>INK4A/ARF</sup> peut être induite par une sur-expression d'oncogènes tels que Myc (Zindy et al., 1998), la protéine adénovirale E1A (de Stanchina et al., 1998), E2F-1 (Bates et al., 1998), Ras (Palmero et al., 1998) et v-Abl (Radfar et al., 1998).

L'expression de p15<sup>INK4B</sup> est surtout induite suite à un traitement avec le TGF $\beta$  (Hannon et Beach, 1994; Reynisdottir et Massague, 1997; Sandhue et al., 1997). Quant aux autres membres, p18<sup>INK4C</sup> et p19<sup>INK4D</sup>, ils sont beaucoup moins connus. Il s'agirait des seuls membres de la famille d'inhibiteurs INK4 à être exprimés durant l'embryogenèse chez la souris (Zindy et al., 1997a; Zindy et al., 1997b). De plus, contrairement à p16<sup>INK4A</sup> et p15<sup>INK4B</sup>, les niveaux d'expression de p18<sup>INK4C</sup> et p19<sup>INK4D</sup> oscillent au cours de la progression du cycle cellulaire : leurs niveaux d'expression protéique atteignent une valeur maximale à la fin de la phase G1 et pendant la phase S du cycle cellulaire et reviennent à un niveau d'expression basal au début de la phase G1 (Hirai et al., 1995). De plus, il a été démontré qu'un traitement des

cellules Daudi avec l'interféron  $\alpha$  modifie le patron d'expression de p18<sup>INK4C</sup> (Sangfelt et al., 1997), tandis que l'interleukine-6 induit l'expression des inhibiteurs p18<sup>INK4C</sup> et p19<sup>INK4D</sup> dans les cellules hématopoïétiques, ce qui corrèle avec un arrêt en phase G1 et une différenciation terminale (Morse et al., 1997). Il a également été rapporté que l'expression de p18<sup>INK4C</sup> augmentait au cours de la différenciation des adipocytes (Phelps et Xiong, 1998b), des lymphocytes B (Schrantz et al., 2000) et des myoblastes (Franklin et Xiong, 1996; Phelps et al., 1998a).

La deuxième famille d'inhibiteurs possède un plus large spectre d'action. Leur aptitude à bloquer l'activité des complexes cycline D-cdk4/6 et cycline E-cdk2 en font des inhibiteurs généraux regroupés sous le terme de « cdk inhibitory protein » ou encore « kinase inhibitory protein » (Cip/Kip). Trois membres constituent cette famille : p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> et p57<sup>Kip2</sup>.

Le rôle de p21 dans la régulation de la progression de la phase G1 du cycle cellulaire est bien particulier. En effet, paradoxalement, son expression est induite dans les fibroblastes durant la transition G0-G1 (Li et al., 1994). En fait, il a été démontré que l'assemblage efficace des complexes cycline-cdk ainsi que leur stabilité nécessitent l'action des inhibiteurs du cycle cellulaire de la famille Cip/Kip (Cheng et al., 1999; LaBaer et al., 1997). Ainsi, p21 agit comme facteur d'assemblage pour les complexes cycline-cdk lorsqu'une seule molécule est liée au complexe, tandis que la liaison de plusieurs molécules médie l'inactivation du complexe et ainsi l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire (Zhang et al., 1994; Sherr, 1994). Une seconde notion

importante est le contrôle de l'expression de cet inhibiteur par le gène suppresseur de tumeur et facteur de transcription p53 (El-deiry et al., 1993). En effet, il est bien connu que p53 médie un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN occasionnés par les radiations ionisantes (Kastan et al., 1991; Kuerbitz et al., 1992). Dans ces situations, il apparaît que cette fonction d'inhibition de la prolifération de p53 passe via l'inhibiteur p21 (Deng et al., 1995). En effet, les souris présentant une délétion dans le gène de p21 se développent normalement. Cependant, les fibroblastes d'embryon issus de ces souris ne s'arrêtent plus en phase G1 du cycle cellulaire suite à des dommages à l'ADN (Deng et al., 1995). Finalement, p21 a aussi été isolé en tant que protéine qui s'accumulait dans des fibroblastes entrant en sénescence suggérant un rôle de cet inhibiteur dans la perte de la capacité proliférative des cellules âgées (Noda et al., 1994).

Quant à l'inhibiteur p27, contrairement à p21, son expression est élevée dans les cellules quiescentes et décline durant la transition G0-S (Sherr et Roberts, 1995). De plus, il a été montré que p27 joue un rôle dans le maintien de l'état de quiescence (Rivard et al., 1996). Tout comme p21, il joue également un rôle, à faible concentration, dans l'assemblage des complexes cycline-cdk (Cheng et al., 1999). Il a été décrit que l'expression de p27 est fortement induite par certains signaux anti-prolifératifs tels que le TGF $\beta$  (Polyak et al., 1994), l'absence de facteurs de croissance (Kato et al., 1994; Nourse et al., 1994; Polyak et al., 1994) et les contacts cellule-cellule

(Polyak et al., 1994). De plus, il est intéressant de noter que les souris dont le gène de p27 a été délété sont anormalement grosses, présentent plusieurs organes hyperplasiques et sont prédisposées à développer des tumeurs du thymus (Fero et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Nakayama et al., 1996).

Dans le cas de p57, par opposition à l'expression ubiquiste de p21 et p27, l'expression de p57 se limite à quelques tissus notamment l'épithélium intestinal (Deschênes et al., 2001; Sherr et Roberts, 1995). De plus, contrairement aux souris knock-out p21 et p27, la majorité des souris dont le gène de p57 a été délété meurt peu de temps après la naissance dû à des défauts majeurs dans leur développement suggérant un rôle important de cet inhibiteur du cycle cellulaire dans le développement chez la souris qui ne peut être compensé par les autres membres de la famille Cip/Kip (Takahashi et al., 2000; Yan et al., 1997; Zhang et al., 1997a). Une particularité intéressante chez les souris knock-out p57 est la détection d'anomalies gastro-intestinales pouvant aller de l'inflation du tractus gastro-intestinal à la perte de jéjunum et d'iléon (Yan et al., 1997).

Il est à noter qu'une augmentation d'expression des trois inhibiteurs de la famille Cip/Kip, p21, p27 et p57, est observée dans les cellules épithéliales intestinales à l'atteinte et pendant la confluence; l'atteinte de la confluence marquant l'arrêt en phase G1 du cycle cellulaire et l'induction de la différenciation entérocytaire (Deschênes et al., 2001; Evers et al., 1996; Gartel et al., 1996).

## **2.2. LA CASCADE MEK/ERK : UNE VOIE DE SIGNALISATION IMPLIQUÉE DANS LA RÉGULATION DE LA PROLIFÉRATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES**

### **2.2.1. Composants et Régulation de la cascade MEK/ERK**

Les changements qui s'opèrent dans l'environnement extracellulaire sont perçus et interprétés par la cellule. Plus précisément, les récepteurs transmembranaires captent le message extracellulaire et activent une signalisation intracellulaire qui décode le message et apporte une réponse cellulaire adéquate qui résulte souvent d'une modulation de l'expression génique. La cascade MEK/ERK est l'une de ces voies de signalisation intracellulaire souvent empruntée par la cellule pour répondre à des signaux extracellulaires (présence d'hormones ou de facteurs de croissance) qui influencent la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Pearson et al., 2001; Schaeffer et Weber, 1999).

La voie classique d'activation de cette cascade (Figure 6) consiste en l'activation de la petite protéine G membranaire Ras qui, sous sa forme liant le GTP, permet le recrutement et l'activation de la sérine/thréonine kinase Raf à la membrane. Le message se transmet par la suite aux kinases à double spécificité MEK. Ces dernières sont responsables de la double phosphorylation sur résidus thréonine et tyrosine des ERK, double phosphorylation qui est essentielle à leur activité sérine/thréonine kinase. Une fois activées, les ERK peuvent à leur tour phosphoryler certains substrats

## MAPK/ERK In Growth and Differentiation

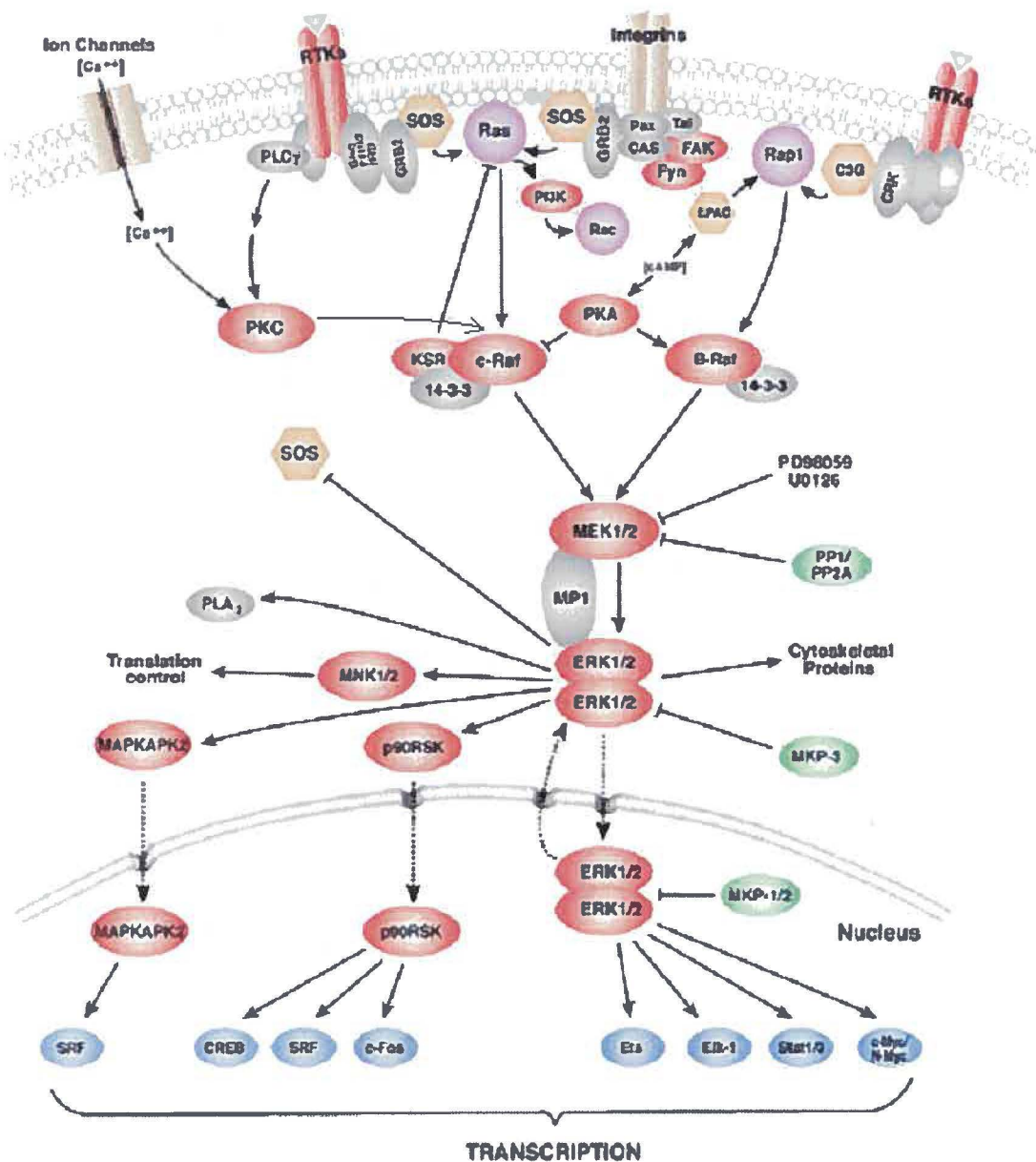


FIGURE 6. LA CASCADE Ras/Raf/MEK/ERK

Tiré et modifié de Cell Signaling Biotechnology ([www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)). Pour détails, voir texte.

cytoplasmiques ou membranaires ou, dans la plupart des cas, transloquer au noyau et phosphoryler des facteurs de transcription pour en influencer leur activité transcriptionnelle.

Il existe différentes isoformes pour chacun des composants de la cascade MEK/ERK. Trois isoformes de Ras, K-Ras, N-Ras et H-Ras, sont aptes à activer Raf. L'efficacité d'activation de Raf par ces différentes isoformes ne serait pas équivalente; K-Ras>>N-Ras>H-Ras (Voice et al., 1999). Il a été suggéré que N-Ras serait l'isoforme principal qui contrôlerait la prolifération cellulaire dans les cellules non-transformées (Hamilton et Wolfman, 1998) alors que la mutation de K-Ras, rendant celui-ci constitutivement actif, dans plus de 30% de tous les cancers et 50% des cancers colo-rectaux contribuerait à l'hyperprolifération des cellules cancéreuses (Bos, 1988; Forrester et al., 1987; Fearon et Vogelstein, 1990).

En plus d'être contrôlée positivement par Ras, l'activité de Raf-1 peut aussi être modulée positivement par les différentes PKC. Le mécanisme d'action des différentes PKC pour activer Raf-1 n'est cependant pas clairement défini. Il a été suggéré que certaines PKC pouvaient directement influencer l'activité de Raf-1 via sa phosphorylation par les PKC (Carroll et May, 1994; Kolch et al., 1993) ou indirectement via des mécanismes inconnus (Schönwasser et al., 1998). L'activité de Raf-1 peut également être régulée négativement par les protéines sérine/thréonine kinases AKT (Zimmermann et Moelling, 1999; Moelling et al., 2002) et PKA (Hafner et al.,

1994; Wu et al., 1993) par des mécanismes impliquant une phosphorylation inhibitrice de Raf-1 par AKT et PKA .

Quant à Raf lui-même, il existe également sous trois isoformes : A-Raf, B-Raf et Raf-1 (ou c-Raf) (Hagemann et Rapp, 1999). A-Raf activerait préférentiellement MEK1, B-Raf lierait MEK1 et MEK2 mais activerait davantage MEK1 alors que Raf-1 n'aurait pas de préférence dans la liaison et l'activation de MEK1 ou MEK2 (Schaeffer et Weber, 1999). L'expression ubiquiste de Raf-1 en fait l'isoforme la plus étudiée et la plus associée à l'activation de la cascade MEK/ERK en relation avec la prolifération cellulaire (Pearson et al., 2001).

Pour les isoformes MEK1 et MEK2, elles sont capables d'activer leurs uniques substrats, les ERK1 et ERK2, avec autant d'efficacité. Il a été démontré que la phosphorylation sur résidus thréonine et tyrosine de ERK2 par MEK permet un changement de conformation de la protéine créant une poche catalytique spécifique pour les résidus proline (Canagarajah et al., 1997). En effet, le site consensus de phosphorylation des ERK1 et ERK2 sur leurs substrats potentiels est une séquence S/T-P ou préférentiellement P-X-S/T-P (où S/T=sérine/thréonine, P=proline, X=n'importe quel acide aminé) (Songyang et al., 1996). Il est à noter que jusqu'à présent, les isoformes ERK1 et ERK2 partagent les mêmes substrats.

Il est maintenant reconnu qu'en plus de posséder un site consensus de phosphorylation par les ERK, les substrats potentiels des ERK1/2 doivent aussi disposer de sites d'ancrages (docking sites). D'abord un site d'ancrage



commun à toutes les MAPK (ERK, p38 et JNK) appelé domaine CD (common domain) et qui correspond à un motif LxL en aval d'une région contenant plusieurs résidus basiques qui sont reconnus par des résidus acides présents dans la séquence des MAPK (Tanoue et al., 2000). Ce site servirait également d'ancrage pour les activateurs en amont, MAPKK, et les inactivateurs, MKP (MAPK phosphatase) sur les MAPK. En plus, il existe un second motif, FXFP (où F= phénylalanine, X=n'importe quel acide aminé, P=proline), spécifique aux ERK qui, lorsque présent dans la séquence du substrat, stabilise l'interaction ERK-substrat et favorise davantage la phosphorylation du substrat par les ERK (Jacobs et al., 1999).

Jusqu'à présent, les substrats des ERK identifiés sont surtout des facteurs de transcription comme Elk-1, c-Ets-1, c-Ets-2, c-Fos, et c-Myc (Treisman, 1996). Cependant, le récepteur à l'EGF (Northwood et al., 1991), la phospholipase A2 (Lin et al., 1993), la p90RSK (Blenis, 1993), le facteur d'échange pour Ras, SOS (Cherniack et al., 1994), la MLCK (Klemke et al., 1997) et la tropomyosine (Houle et al., 2003) ont également été rapportés comme cibles des ERK.

Le schéma général de la cascade MEK/ERK suggère qu'en absence de stimulus, les ERK1/2 sont retenues dans le cytoplasme en association avec les MEK1/2 qui possèdent une séquence d'exportation nucléaire (Bardwell et Thorner, 1996; Fukuda et al., 1997). Suite à une stimulation de la cascade MEK/ERK, les ERK phosphorylées se dissocient de la MEK et entrent dans le noyau où elles phosphorylent des facteurs de transcription,

modulant l'expression génique et initiant une réponse cellulaire. Cette réponse cellulaire est influencée par la durée d'activation des ERK. Il a récemment été démontré que les produits des gènes à réponse immédiate (immediate early gene) jouaient un rôle dans la perception de la durée du signal et dans l'interprétation cellulaire de ce signal (Murphy et al., 2002). De plus, le signal peut être interprété différemment selon le type cellulaire. Ainsi, seulement une activation soutenue des ERK permet l'entrée en phase S dans les fibroblastes (Meloche et al., 1992; Cook et McCormick, 1996; Weber et al., 1997; Balmano et Cook, 1999; Vouret-Craviari et al., 1993) alors que dans les cellules PC12, l'activation soutenue des ERK précède une différenciation de type neuronal (Marshall, 1995). Dans les cellules épithéliales intestinales, le phénomène ressemble à ce qui est observé dans les fibroblastes puisqu'il a été démontré que l'EGF et le sérum amènent une activation soutenue des ERK1/2 qui corrèle avec l'entrée en phase S des cellules (Aliaga et al., 1999; Rivard et al., 1999).

Dans les fibroblastes, l'entrée et l'accumulation dans le noyau des ERK1/2 pendant la phase G1 (Fukuda et al., 1997) est une étape importante associée à la prolifération cellulaire. En effet, il a été démontré que la translocation nucléaire des ERK1/2 était indispensable à la réplication de l'ADN induite par les facteurs de croissance (Brunet et al., 1999; Kim-Kaneyama et al., 2000) en plus d'être essentielle à la transformation cellulaire (Robinson et al., 1998).

Finalement, suite à une stimulation de l'activité de la cascade MEK/ERK, celle-ci doit être désactivée afin d'arrêter le signal et permettre une éventuelle réactivation. Cette étape est principalement contrôlée par les phosphatases. Comme la double phosphorylation sur résidu thréonine et tyrosine des ERK1/2 est essentielle à leur activité, une déphosphorylation sur l'un et/ou l'autre de ces résidus est suffisante pour éteindre l'activité des ERK1/2. Ainsi, trois types de phosphatases peuvent agir pour régulariser négativement l'activité de la cascade MEK/ERK : des phosphatases à double spécificité, des tyrosine phosphatases et des sérine/thréonine phosphatases (Keyse 2000). La famille des phosphatases à double spécificité comprend 10 membres. Parmi ceux-ci, CL100/MKP-1, PAC-1, hVH2/MKP-2/Typ-1 et hVH3/B23 constituent des phosphatases nucléaires rapidement induites (immediate early gene) suite à une stimulation de la cascade MEK/ERK. Un autre groupe de phosphatases à double spécificité, hVH5/M3/6, Pyst1/MKP-3/rVH6, Pyst2/MKPX, MKP-4 et MKP-5, représente plutôt des protéines cytoplasmiques dont l'expression est constitutive. Finalement, la phosphatase VHR est le dernier membre de cette famille. Les tyrosine phosphatases PTP-SL/PTBR7/PC12-PTP1/STEP, HePTP/LC-PTP et sérine/thréonine phosphatases PP2A et PP2C $\alpha$  sont également capables d'agir pour inhiber l'activité de la cascade MEK/ERK. Il a été suggéré dans les fibroblastes que l'induction rapide de l'expression de MKP-1 et MKP-2 suite à l'activation de la cascade MEK/ERK par un agent mitogène était responsable de l'inactivation nucléaire des ERK1/2 (Volmat et al., 2001).

### 2.2.2. Régulation du cycle cellulaire par la cascade MEK/ERK

Le doublement de la masse cellulaire et la duplication du contenu protéique de la cellule sont des étapes essentielles à la progression de la phase G1 du cycle cellulaire jusqu'au point de restriction (Polymenis et Schmidt, 1999). Ainsi, la régulation de la synthèse polypeptidique joue un rôle important dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Une étape cruciale dans l'initiation de la traduction est le recrutement des ARNm à la sous-unité 40S des ribosomes. Cette étape est possible grâce à la présence d'une structure « cap » en extrémité 5' des ARNm reconnue par un complexe d'initiation de la traduction eIF4F (eukaryotic initiation factor 4F). Ce complexe est composé de trois sous-unités : eIF4E, eIF4A et eIF4G (Pyronnet et Sonenberg, 2001). Le facteur eIF4E est considéré comme le principal régulateur du complexe d'initiation de la traduction dans plusieurs systèmes cellulaires entre autres parce qu'il n'est retrouvé qu'en quantité limitée dans la cellule (Duncan et al., 1987; Rau et al., 1996). De plus, eIF4E lui-même est régulé par phosphorylation : le statut de phosphorylation de eIF4E corrèle directement avec le taux de synthèse protéique (Pyronnet et Sonenberg, 2001). Il a été montré que le traitement des cellules avec des facteurs de croissance, des hormones et des mitogènes amenait la phosphorylation de eIF4E (Flynn et Proud, 1995; Joshi et al., 1995; Makkinje et al., 1995). Le candidat idéal identifié pour phosphoryler eIF4E est le substrat des ERK1/2 : Mnk1 (Fukunaga et Hunter, 1997; Pyronnet et al., 1999; Waskiewicz et al., 1997). Ainsi, la cascade MEK/ERK favorise la

progression de la phase G1 du cycle cellulaire en contrôlant positivement la synthèse protéique.

Également, afin d'influencer la prolifération cellulaire, la cascade MEK/ERK agit sur l'expression de régulateurs de la phase G1, l'étape limitative du cycle cellulaire. D'une part, il est largement documenté que l'activité de la cascade MEK/ERK module positivement la transcription (via les facteurs de transcription c-Ets-2 et AP-1) et par conséquent l'expression de la cycline D1, la sous-unité régulatrice du complexe cycline D1-cdk4/6 nécessaire à la phosphorylation de pRb et à la transition G1-S suite à l'ajout d'agents mitogènes (Albanese et al., 1995; Balmano et Cook, 1999; Danen et al., 2000; Greulich et Erikson, 1998; Lavoie et al., 1996). De plus, il a été rapporté que l'activation de la MEK1 favorisait l'assemblage des cyclines D néo-synthétisées avec leurs partenaires catalytiques cdk4/6 (Cheng et al., 1998).

Suite à une stimulation par des agents mitogènes, il a été démontré que l'expression de p21 est transitoirement augmentée d'une façon dépendante des ERK (Bottazzi et al., 1999; Liu et al., 1996) appuyant dans ce cas le rôle positif de p21 dans l'assemblage des complexes cycline-cdk. L'augmentation d'expression de p21 par la cascade MEK/ERK a surtout été attribuée à un effet transcriptionnel (Balmano et Cook, 1999; Bottazzi et al., 1999; Danen et al., 2000; Olson et al., 1998). Cependant, il a récemment été rapporté dans les cellules transformées que la cascade MEK/ERK n'influçait pas l'expression de l'ARNm mais augmentait plutôt la stabilité de

la protéine p21 (Coleman et al., 2003). Pour permettre une progression jusqu'à la phase S du cycle cellulaire, l'augmentation d'expression de p21 amenée par la cascade MEK/ERK suite à l'ajout d'agents mitogènes doit cependant être atténuée par un mécanisme impliquant l'activité de la petite protéine G Rho (Danen et al., 2000; Olson et al., 1998). En effet, il est maintenant bien connu que, dans les cellules normales, la sur-activation de Ras ou de Raf, sans une activation concomitante de la cascade en aval de Rho, ne favorise pas la prolifération cellulaire mais induit plutôt un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire dû à la trop forte augmentation d'expression de p21 (Sewing et al., 1997; Woods et al., 1997).

Dans les fibroblastes et les cellules épithéliales intestinales, il a été montré que la stimulation de la cascade MEK/ERK était nécessaire et suffisante à la diminution d'expression de l'inhibiteur p27 (Greulich et Erikson, 1998; Rivard et al., 1999), une étape nécessaire à la progression de la phase G1 du cycle cellulaire. Un mécanisme proposé pour expliquer cet effet est la phosphorylation de p27 par les ERK qui ne peut alors plus lier cdk2 et agir en tant qu'inhibiteur des complexes cycline-cdk (Alessandrini et al., 1997; Kawada et al., 1997).

Finalement, il y a également des indications dans la littérature qui appuient un rôle positif de la cascade MEK/ERK dans la progression G2/M du cycle cellulaire. En effet, il a été montré que l'inhibition de la cascade MEK/ERK retarde l'entrée en mitose (Abbott et Holt, 1999; Roberts, et al., 2002; Wright et al., 1999). Des mécanismes moléculaires proposés résident

en la possibilité que l'inhibition de la cascade MEK/ERK 1- retarde l'activation de cdc2 (Wright et al., 1999), ou 2- empêche la translocation nucléaire de la cycline B1 (Roberts et al., 2002) qui, lorsque liée à sa partenaire catalytique cdc2, favorise l'entrée en mitose.

### **2.2.3. La cascade MEK/ERK et la prolifération des cellules épithéliales intestinales**

Plusieurs études ont mis en valeur le rôle positif de la cascade MEK/ERK dans la prolifération des cellules épithéliales intestinales. Dans les cellules normales immortalisées provenant de la crypte de l'intestin de rat IEC-6, l'inhibiteur pharmacologique de MEK, PD98059, bloque l'entrée en phase S et la prolifération cellulaire induite par l'EGF (Aliaga et al., 1999; Kaiser et al., 1999) et le sérum (Rivard et al., 1999). Toujours dans les cellules IEC-6, il a été démontré que l'exposition des cellules à un milieu conditionné par des cellules blessées stimule la prolifération cellulaire via un mécanisme TGF $\alpha$ - et ERK-dépendant (Göke et al., 1998). Dans un autre clone de cellules épithéliales intestinales de rat, IEC-18, l'incorporation de thymidine tritiée au niveau de l'ADN induite par la vasopressine (Chiu et al., 2002) et l'angiotensine II (Chiu et al., 2003) est inhibée lorsque les cellules sont traitées avec l'inhibiteur PD98059. Dans les cellules de cancer de colon humain Caco-2, la cascade MEK/ERK est nécessaire à la prolifération cellulaire amenée par le GLP-2 (Jasleen et al., 2000) et par les déformations mécaniques répétitives (Li et al., 2001). De plus, dans le clone cellulaire

Caco-2/15, l'inhibition de la cascade MEK/ERK par l'inhibiteur PD98059, par un mutant à activité dominante négative de la p44 ou par l'expression de la MKP-1 bloque la transition G1-S alors que l'expression d'une forme constitutive active d'une MEK a l'effet inverse (Aliaga et al., 1999).

Dans l'épithélium intestinal de poulet, il a été démontré que ERK2 était phosphorylée et active exclusivement dans les cellules indifférenciées et prolifératives de la crypte (Mamajiwalla et Burgess, 1995). Des résultats similaires ont été obtenus dans l'épithélium intestinal humain fœtal où la forme active des ERK1/2 (doublement phosphorylée) est détectée uniquement dans le noyau des cellules cryptales (Aliaga et al., 1999).

Plusieurs indications suggèrent que les ERK1/2 contribueraient à la prolifération anarchique des cellules cancéreuses de colon. En effet, l'analyse de plusieurs lignées cellulaires développées à partir de tumeurs coloniques dévoile que 41% de ces lignées présentent une activité constitutive des ERK1/2 (Hoshino et al., 1999). De plus, il a été relevé que l'activité des ERK1/2 dans les cellules de carcinomes de colon était supérieure à l'activité des ERK1/2 retrouvée dans les cellules de la muqueuse normale (Ostrowski et al., 1998). Récemment, il a également été montré, à l'aide de souris transgéniques, que l'expression d'une forme oncogénique de K-Ras dans les cellules épithéliales intestinales menait à une activation constitutive des ERK1/2 qui corrélait avec le développement de tumeurs intestinales dans 31 des 41 souris analysées (Janssen et al., 2002).



Finalement, l'inhibition de la cascade MEK/ERK bloque la croissance de tumeurs coloniques in vivo (Sebolt-Leopold et al., 1999).

Pris ensemble, ces résultats suggèrent une contribution de la cascade MEK/ERK dans la prolifération des cellules épithéliales intestinales. Il semble évident que la cascade MEK/ERK soit nécessaire à la prolifération des cellules épithéliales intestinales. Cependant, d'autres expériences sont requises pour déterminer si l'activation de cette cascade est suffisante en elle-même à induire la prolifération des cellules épithéliales intestinales.

## **2.3. RÉGULATION DE LA PROLIFÉRATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES**

### **2.3.1. Rôle des composants luminaux, peptides gastro-intestinaux, cytokines et facteurs Wnt**

Plusieurs facteurs peuvent moduler la prolifération des cellules épithéliales intestinales (Babyatsky et Podolsky, 1999; Drucker, 1997). Diverses expériences appuient l'hypothèse que des facteurs retrouvés au niveau de la lumière intestinale peuvent influencer la prolifération des cellules de l'épithélium. Les polyamines spermidine, spermine et leur précurseur putrescine présents dans l'alimentation permettent la croissance de la muqueuse. Les fibres alimentaires, les acides gras et certains acides aminés (dont la glutamine) joueraient également un rôle positif dans la prolifération des cellules épithéliales intestinales. De plus, les sécrétions pancréatiques et biliaires arrivant dans le duodénum pourraient influencer la prolifération des

cellules épithéliales de l'intestin proximal puisque la diversion de ces sécrétions dans l'iléon cause une hyperplasie de la muqueuse de l'iléon (Babyatsky et Podolsky, 1999; Drucker, 1997).

De nombreux peptides gastro-intestinaux semblent impliqués dans le contrôle de la prolifération des cellules épithéliales intestinales. Certaines évidences suggèrent que l'IGF-I, l'IGF-II, l'EGF, le TGF $\alpha$ , le KGF, la gastrine, la bombésine, le GLP-2, le PYY et la neurotensine peuvent avoir des effets trophiques sur la muqueuse intestinale. Quant au TGF $\beta$ , au VIP et à la somatostatine, des effets directs ou indirects de ces peptides sur les cellules épithéliales intestinales résulteraient en une régulation négative de la prolifération (Babyatsky et Podolsky, 1999; Drucker, 1997).

Des études chez des cellules de rongeurs suggèrent que certaines cytokines (IL-11, IL-3 et IL-15) pourraient aussi stimuler la prolifération des cellules épithéliales intestinales et favoriser la régénération épithéliale *in vivo* (Drucker, 1997).

Finalement, des expériences récentes appuient fortement l'implication des facteurs Wnt, des glycoprotéines sécrétées, dans la régulation positive de la prolifération des cellules épithéliales intestinales (Bienz et Clevers, 2000; Pinto et al., 2003). De plus, des mutations activant différents effecteurs de la cascade empruntée par les facteurs Wnt mènent à la formation de polypes, la première étape vers le développement du cancer colo-rectal (Fodde et al., 2001; Kinzler et Vogelstein, 1996). La présence de mutations activant la cascade Wnt dans les lésions pré-malignes au niveau de l'intestin suggère

que ces mutations pourraient initier la transformation des cellules épithéliales intestinales (Powell et al., 1992).

### **2.3.2. Rôle des jonctions adhérentes**

En plus des facteurs extracellulaires qui régularisent la prolifération des cellules épithéliales intestinales, l'intégrité des jonctions adhérentes, en plus de jouer un rôle dans l'adhésion cellule-cellule et maintenir l'intégrité de la monocouche épithéliale, peut aussi influencer la prolifération. Plusieurs études appuient cette hypothèse. La sur-expression ciblée de la E-cadhérine dans les cellules de l'épithélium intestinal réduit de plus de 50% le nombre de cellules mitotiques dans la région médiane de la crypte (Hermiston et al., 1996). À l'opposé, une hyperprolifération des cellules de la crypte et la formation d'adénomes sont observées dans l'épithélium intestinal exprimant un dominant-négatif de la N-cadhérine (Hermiston et Gordon, 1995b). De plus, il a été proposé que la E-cadhérine jouerait un rôle suppresseur de tumeur dans les cellules d'origine épithéliale (Birchmeier et Behrens, 1994; Takeichi, 1993). Dans les cancers colo-rectaux, une perte d'expression de la E-cadhérine a été rapportée (Dorudi et al., 1995; Kinsella et al., 1994; Nigam et al., 1993) alors que la ré-expression de la E-cadhérine dans des cellules issues de cancer de colon humain, LS174T, inhibe la prolifération de ces cellules (Efsthathiou et al., 1999).

### **3. DIFFÉRENCIATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES**

Les cellules-filles issues de la division des cellules souches situées à la base de la crypte migrent vers le haut de la crypte tout en entamant un processus de différenciation entérocytaire. Dans la majorité des cas, cette différenciation cellulaire donne naissance aux cellules absorbantes qui représentent plus de 80% des cellules épithéliales de l'intestin (Karam, 1999). Ainsi, au niveau de la crypte, on retrouve des cellules prolifératives dans le tiers inférieur puis des cellules-filles en transition qui perdent progressivement leur capacité proliférative et acquièrent graduellement des marqueurs de différenciation essentiels pour l'accomplissement de leur rôle digestif au niveau de la villosité.

#### **3.1. MARQUEURS DE DIFFÉRENCIATION DES CELLULES ABSORBANTES**

Au cours de la différenciation en cellule absorbante, les cellules vont se polariser c'est-à-dire qu'elles vont s'allonger pour présenter une structure cylindrique avec un noyau situé basolatéralement. Il y aura également acquisition de jonctions intercellulaires et d'une bordure en brosse apicale (Karam, 1999). De plus, au cours de la différenciation, il y aura induction de l'expression d'enzymes digestives au niveau de la membrane apicale : sucrase-isomaltase, lactase-phlorizine hydrolase, maltase-glucoamylase, tréhalase, aminopeptidase A et N, entéropeptidase,  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase,

dipeptidyl peptidase IV, endopeptidase 24.11, enzyme de conversion à l'angiotensine et phosphatase alcaline (Ménard et Beaulieu, 1994). La sucrase-isomaltase est de loin le marqueur fonctionnel le plus utilisé pour confirmer une différenciation de type entérocytaire et identifier la membrane apicale des cellules absorbantes. La membrane basolatérale peut elle aussi être repérée grâce à la localisation spécifique de la  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase qui pompe le sodium ( $\text{Na}^+$ ) à l'extérieur de la cellule. En effet, une concentration intracellulaire faible de  $\text{Na}^+$  favorise le transport vectoriel des nutriments et des ions cotransportés avec le  $\text{Na}^+$  de la surface apicale vers la surface basolatérale (Rubin, 1999).

### **3.2. RÉGULATION DE LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES**

#### **3.2.1. Rôle des composants luminaux et des peptides gastro-intestinaux**

Des études ont suggéré un rôle pour certains composés luminaux et peptides gastro-intestinaux dans la différenciation entérocytaire (Babyatsky et Podolsky, 1999; Ménard, 1989). Même si les éléments de l'alimentation ne régulariseraient pas fondamentalement le développement gastro-intestinal, ils pourraient moduler le processus. Entre autres, une alimentation riche en hydrates de carbone stimule le transport du glucose en augmentant le nombre de transporteurs du glucose le long de l'axe crypte-villosité. Des éléments retrouvés dans le lait maternel, comme l'EGF, l'IGF-I et l'insuline, pourraient

aussi influencer la maturation de l'épithélium intestinal (Babyatsky et Podolsky, 1999; Ménard, 1989).

Malgré une modulation possible du développement intestinal par des éléments retrouvés dans la lumière intestinale, il semblerait que les éléments agissant au niveau basolatéral auraient beaucoup plus d'impact sur le développement intestinal. Parmi les éléments répertoriés pour moduler la maturation intestinale, mentionnons les glucocorticoïdes, la thyroxine, l'EGF, le  $TGF\alpha$ , la gastrine, l'insuline, l'entéroglucagon, la galanine, le VIP, la substance P et le peptide relié au gène de la calcitonine (Babyatsky et Podolsky, 1999; Ménard, 1989). Sans influencer le développement fœtal, les bactéries colonisant l'intestin pourraient elles aussi jouer un rôle dans le développement post-natal de l'intestin (Babyatsky et Podolsky, 1999; Ménard, 1989).

### **3.2.2. Rôle des facteurs de transcription cdx1 et cdx2**

Plusieurs évidences suggèrent que les facteurs de transcription à homéodomaine cdx1 et cdx2 jouent un rôle important dans la différenciation intestinale. D'abord, dans l'embryon de souris en développement, l'expression de cdx1 (Duprey et al., 1988; Meyer et Gruss, 1993) et cdx2 (James et al., 1994) survient entre le jour 14 et 15 post-coïtum lorsque l'endoderme se transforme en épithélium cylindrique simple et forme des villosités, une étape primordiale dans le développement intestinal. Chez la souris adulte, l'expression de cdx1 et cdx2 demeure restreinte à l'épithélium

intestinal (James et al., 1994; Meyer et Gruss, 1993). De plus, la sur-expression de cdx1 (Soubeyran et al., 1999) ou cdx2 (Lorentz et al., 1997; Suh et Traber, 1996) dans des cellules d'origine épithéliale intestinale, IEC-6 ou Caco2-TC7, induit un certain degré de différenciation entérocytaire. Finalement, les promoteurs de la sucrase-isomaltase (James et al., 1994), de la lactase (Fang et al., 2000) et d'autres gènes spécifiques à l'intestin (Levy et al., 1995; Suh et al., 1994) contiennent des éléments de réponse liant cdx2 appuyant le rôle important de cdx2 dans la transcription de gènes exprimés spécifiquement au niveau de l'intestin. Ainsi, il est facile de s'imaginer que les facteurs qui régularisent l'expression, la liaison à l'ADN et la capacité transcriptionnelle de cdx1 et/ou cdx2 peuvent influencer la différenciation épithéliale intestinale.

### **3.2.3. Rôle des jonctions adhérentes**

Les jonctions adhérentes, spécialement la E-cadhérine, jouent un rôle de premier plan dans le maintien de l'architecture et de la fonction de l'épithélium intestinal. En effet, en plus de contribuer au maintien de la monocouche barrière de l'épithélium et d'influencer la prolifération cellulaire, l'intégrité des jonctions adhérentes participe aussi au processus de différenciation épithéliale (Larue et al., 1996; Takeichi, 1995; Vleminckx et Kemler, 1999). Dans les cellules MDCK, l'abolition de l'adhésion médiée par la E-cadhérine mène à une dédifférenciation cellulaire où les cellules adoptent une morphologie de type fibroblastique (Behrens et al., 1985). À l'opposé,

l'expression de la E-cadhérine dans des cellules non-épithéliales peut mener à la formation d'une monocouche adhérente polarisée ressemblant à celle adoptée par les cellules épithéliales (McNeill et al., 1990; Nagafuchi et al., 1987). Dans les cellules épithéliales intestinales, l'expression des cadhérines est importante pour le maintien de l'état différencié. En effet, l'expression d'un mutant à activité dominante négative de la N-cadhérine dans les cellules de la villosité de l'épithélium intestinal chez la souris affecte la polarité cellulaire visualisée par la perte d'une bordure en brosse apicale et la désorganisation de l'actine (Hermiston et Gordon, 1995a).

Récemment, les résultats obtenus par le Dr Rivard en utilisant les cellules de carcinome de colon humain Caco-2/15, bien caractérisées pour leur capacité à entamer spontanément un processus de différenciation entérocytaire après l'atteinte de la confluence, ont permis de confirmer le rôle important des jonctions adhérentes dans la différenciation épithéliale intestinale. L'équipe du Dr Rivard a montré que la signalisation émanant des jonctions adhérentes fonctionnelles favorise une différenciation entérocytaire en influençant la capacité de transactivation du facteur de transcription cdx2 qui lui est important pour l'expression du marqueur de différenciation fonctionnel sucrase-isomaltase (Houde et al., 2001; Laprise et al., 2002). De plus, l'équipe a montré que la signalisation qui influence la formation ou le démantèlement des jonctions adhérentes module, respectivement, positivement ou négativement la différenciation des cellules Caco-2/15 (Laprise et al., 2002).



### **3.3. VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUÉES**

Très peu de choses sont connus sur les voies de signalisation impliquées dans la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Pourtant, l'analyse des voies de signalisation qui régularisent la prolifération, et la différenciation nous permettrait de mieux comprendre la physiologie intestinale et les désordres physiologiques pouvant être associés à une dérégulation de ces voies de signalisation. Jusqu'à présent, seulement un nombre limité de protéines de signalisation a été associé à la différenciation entérocytaire.

#### **3.3.1. La cascade PI3K et p38 MAPK**

Récemment, les expériences issues du laboratoire du Dr Rivard lui ont permis de proposer un modèle fort intéressant sur les voies de signalisation impliquées dans la différenciation épithéliale intestinale (Houde et al., 2001; Laprise et al., 2002). Ce modèle suggère qu'à l'atteinte de la confluence des cellules épithéliales intestinales Caco-2/15, la PI3K est recrutée aux sites de contact cellule-cellule en co-localisation avec la E-cadhérine. Cette co-localisation permet l'assemblage et la maturation des jonctions adhérentes entre autres via l'association des composants de la jonction avec le cytosquelette d'actine. Une fois correctement assemblées, les jonctions adhérentes peuvent alors « émettre » une signalisation qui implique une activation PI3K-dépendante de la sérine/thréonine kinase AKT et de la p38 MAPK. Cette dernière, lorsqu'active, transloque au noyau, s'associe avec le

facteur de transcription cdx2 et le phosphoryle. Cette phosphorylation de cdx2 par la p38 MAPK stimule son activité transcriptionnelle pour ainsi favoriser l'expression du marqueur de différenciation fonctionnel sucrase-isomaltase et l'induction de la différenciation entérocytaire (Houde et al., 2001).

Dans ces études, il a été suggéré que Rac1 pourrait être l'effecteur de la PI3K agissant en favorisant l'assemblage de l'actine corticale aux sites de contact cellule-cellule et ainsi contribuer à la différenciation morphologique (polarisation) des cellules épithéliales intestinales. En ce sens, il a récemment été démontré, en utilisant des souris chimériques, que l'expression d'une forme constitutive active de Rac1 résultait en l'apparition de marqueurs de différenciation des cellules de Paneth dès le jour embryonnaire 18,5 alors que ces marqueurs n'apparaissent normalement qu'entre les jours 7 et 14 post-natals (Stappenbeck et Gordon, 2000). De plus, des marqueurs de différenciation de cellules absorbantes sont retrouvés dans la région inter-villositaire alors que cette région est normalement uniquement peuplée de cellules prolifératives non-différenciées (Stappenbeck et Gordon, 2000).

### **3.3.2. La cascade MEK/ERK**

Une autre voie de signalisation rapportée pour jouer un rôle dans la différenciation épithéliale intestinale est la cascade MEK/ERK. Dans les cellules de cancer de colon humain HT29-18-N2, un groupe a montré que le

traitement de ces cellules avec le PD98059, un inhibiteur pharmacologique de MEK, augmente l'expression des marqueurs de différenciation entérocytaire : la sucrase-isomaltase, la mucine et l'intestinal trefoil factor (ITF) (Taupin et Podolsky, 1999). Dans la lignée parentale HT29, la différenciation induite par le butyrate (Ding et al., 2001) ou un milieu sans glucose (Luongo et al., 2002) corrèle avec une inhibition de l'activité des ERK. Dans les cellules Caco-2, des cellules de cancer de colon humain ayant gardé la capacité de spontanément se différencier après l'atteinte de la confluence, une diminution de l'activité de ERK2 est notée après l'atteinte de la confluence (Ding et al., 2001).

Malgré ces données, parfois peu convaincantes, corrélant inhibition de la cascade MEK/ERK et induction de la différenciation, il semble que le mécanisme soit beaucoup plus complexe. Les résultats les plus concluants ont été obtenus dans le laboratoire du Dr Rivard (Aliaga et al., 1999). En utilisant la lignée cellulaire Caco-2/15, ils ont d'abord observé qu'après l'atteinte de la confluence des cellules, il y a réduction de la phosphorylation des ERK qui corrèle avec la diminution de l'activité de la petite protéine G Ras et l'augmentation d'expression des phosphatases MKP-1 et MKP-3. Cette diminution de l'activité ERK après l'atteinte de la confluence corrèle également avec l'induction du marqueur de différenciation sucrase-isomaltase. Dans un même ordre d'idée, le traitement avec le PD98059 des cellules Caco-2/15 sous-confluentes, qui possèdent une forte activité ERK, stimule l'activité du gène rapporteur sucrase-isomaltase luciférase.

Cependant, le même type d'expérience dans les cellules Caco-2/15 confluentes, qui ont une faible activité ERK, démontre que le traitement avec l'inhibiteur de MEK (PD98059) inhibe l'activité du gène rapporteur sucrase-isomaltase luciférase. Cet effet est confirmé sur l'expression protéique c'est-à-dire que le traitement des Caco-2/15 avec le PD98059 entre les jours 7 et 12 post-confluence inhibe l'activité résiduelle des ERK1/2 et réduit l'expression protéique de la sucrase-isomaltase. De même, dans une culture primaire d'entérocytes différenciés (PCDE), le traitement avec le PD98059 diminue, de manière dose-dépendante, l'expression protéique de la sucrase-isomaltase. Ainsi, il semblerait qu'une réduction de l'activité de la cascade MEK/ERK soit nécessaire à l'induction de la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Cependant, une activité résiduelle de la cascade MEK/ERK semble également requise pour le maintien de l'expression de certains marqueurs de différenciation fonctionnelle.

### ***3.3.2.1. Rôles potentiels de la cascade MEK/ERK dans les cellules épithéliales intestinales différenciées***

Le rôle de la cascade MEK/ERK dans les cellules épithéliales intestinales différenciées demeure inconnu. Cependant, plusieurs indications, en plus de celles rapportées ci-haut, suggèrent effectivement un rôle de cette cascade dans l'entérocyte différencié. Dans l'épithélium intestinal de poulet, un marquage au niveau de la surface apicale des cellules épithéliales est détecté en utilisant un anticorps anti-ERK1 (Mamajiwalla et Burgess, 1995).

Un résultat similaire est obtenu dans l'épithélium intestinal fœtal humain en utilisant un anticorps anti-ERK2 (Aliaga et al., 1999). Cette localisation apicale suggère un rôle de la cascade MEK/ERK dans les cellules de la villosité de l'intestin. Cependant, il est à noter que la forme active des ERK est retrouvée dans le noyau des cellules de la crypte de l'intestin de poulet (Mamajiwalla et Burgess, 1995) et de fœtus humain (Aliaga et al., 1999). Cette localisation nucléaire des ERK, rapportée comme indispensable à la réplication de l'ADN (Brunet et al., 1999; Kim-Kaneyama et al., 2000), et les différentes études mentionnées plus haut (Aliaga et al., 1999; Göke et al., 1998; Kaiser et al., 1999; Mamajiwalla et Burgess, 1995; Rivard et al., 1999;) suggèrent que la cascade MEK/ERK contribue à la prolifération des cellules épithéliales de la crypte de l'intestin. Cependant, le changement de localisation des ERK dans les cellules épithéliales de la villosité suggère une dissociation de la cascade MEK/ERK d'avec ses substrats, surtout nucléaires, associés à la prolifération des cellules cryptales. Ainsi, dans la cellule épithéliale différenciée, une re-localisation des ERK pourrait supposer une compartimentation des ERK nécessaire pour l'accessibilité à de nouveaux substrats et, par le fait même, à l'émission d'une nouvelle réponse cellulaire.

Bien que la voie classique d'activation de la cascade MEK/ERK dirige les ERK vers le noyau où elles phosphorylent des facteurs de transcription (Treisman, 1996), des substrats non-nucléaires des ERK ont également été identifiés. Entre autres, le récepteur à l'EGF (Northwood et al., 1991), la phospholipase A2 (Lin et al., 1993) la p90rsk (Blenis, 1993) et le facteur

d'échange pour Ras SOS (Cherniack et al., 1994). De plus, il a été démontré que les fonctions des protéines MLCK (Klemke et al., 1997), caldesmone (Childs et al., 1992; Childs et Mak, 1993; D'Angelo et al., 1999; Redwood et al., 1993), cortactine (Campbell et al., 1999) et tropomyosine (Houle et al., 2003) pouvaient être modulées par les ERK. En parallèle, un nombre croissant d'études suggèrent que la cascade MEK/ERK peut amener des réponses cellulaires ne nécessitant pas la transcription *de novo* de gènes. Parmi celles-ci, la migration cellulaire (Klemke et al., 1997; Cheresch et al., 1999), la contraction des microfilaments d'actine (Redwood et al., 1993), la dynamique des microtubules (Earnest et al., 1996; Hoshi et al., 1992), la communication intercellulaire via les jonctions gap (Warn-Cramer et al., 1998) et le maintien de l'intégrité des jonctions serrées (Che et al., 2000; Li et Mrsny, 2000). Ainsi, des rôles potentiels de la cascade MEK/ERK dans la migration cellulaire, dans le contrôle de la dynamique du cytosquelette et dans le maintien de l'intégrité des jonctions pourraient être envisagés dans les cellules épithéliales intestinales différenciées.

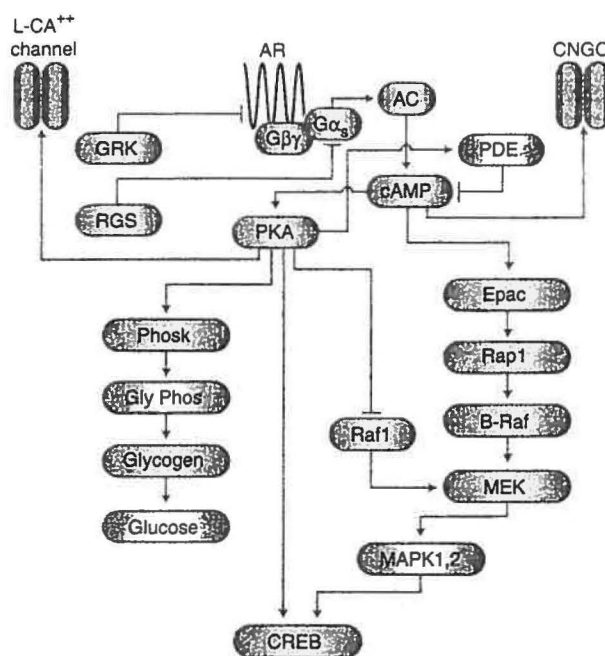
### 3.3.3. La cascade AMPc/PKA

La cascade AMPc/PKA est une autre voie de signalisation empruntée par certains types cellulaires pour initier leur différenciation (Richards, 2001; Vaudry et al, 2002). En effet, la cascade AMPc/PKA est surtout reconnue pour son implication dans la différenciation des cellules d'origine neuronale (Vaudry et al., 2002) et des cellules endocrines des glandes surrénales, des

gonades et de la thyroïde (Richards, 2001). Son rôle dans la différenciation des cellules d'origine épithéliale, spécialement dans les cellules épithéliales intestinales, demeure, quant à lui, plutôt nébuleux.

### **3.3.3.1. Composants et Régulation de la cascade AMPc/PKA**

L'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) intracellulaire est générée suite à l'activation des adénylyl cyclases membranaires, elles-mêmes stimulées par la liaison d'une sous-unité *G $\alpha$ s* d'une protéine Gs associée à un récepteur à sept domaines transmembranaires (Figure 7) (Lodish et al., 2001). L'activation des adénylyl cyclases permet la conversion de l'ATP en AMPc qui agit alors comme second messenger. Même si l'AMPc peut à son tour activer une classe de canaux ioniques (Nakamura et Gold, 1987; DiFrancesco et Tortora, 1991; Gauss et al., 1998) ou des facteurs d'échange pour Rap1, EPAC (exchanging protein directly activated by cAMP) (deRooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998), et Ras, CNrasGEF (Pham et al., 2000), le principal effecteur de l'AMPc est la sérine/thréonine kinase PKA. La PKA inactive est une enzyme tétramérique composée de deux sous-unités catalytiques liées à un dimère de sous-unités régulatrices (Skalhegg et Tasken, 2000). Lorsque deux molécules d'AMPc se lient à chacune des sous-unités régulatrices, il y a dissociation des sous-unités catalytiques qui peuvent alors phosphoryler leurs substrats sur résidus sérine ou thréonine. La séquence consensus minimale de phosphorylation des substrats potentiels par la PKA correspond à une séquence R-X<sub>1-2</sub>-S/T-X où R= arginine, un acide aminé basique, X= n'importe



**FIGURE 7. LA CASCADE AMPc/PKA**  
Tiré de Vaudry et al., 2002. Pour détails, voir texte.



quel acide aminé et S/T= sérine ou thréonine (Kennelly et Krebs, 1991). Un des substrats le mieux caractérisé de la cascade AMPc/PKA est le facteur de transcription CREB (Montminy, 1997).

### **3.3.3.2. Cascade AMPc/PKA versus différenciation épithéliale intestinale**

Chez les cellules épithéliales intestinales, un groupe a déjà rapporté une augmentation de l'activité de la PKA au cours de la différenciation entérocytaire des cellules Caco-2 (Pignata et al., 1994). Ce même groupe a également montré que le traitement des cellules Caco-2 avec l'analogue perméable de l'AMPc, 8Br-cAMP, augmente l'expression de l'ARNm du marqueur de différenciation APO A1. De façon inverse, un autre groupe de recherche a démontré que la forskoline, un activateur bien connu des adénylyl cyclases (Seamon et Daly, 1986), influence négativement la différenciation morphologique (raccourcissement des microvillosités, disparition des espaces intercellulaires) et fonctionnelle (inhibition de l'expression de l'ARNm et de la protéine sucrase-isomaltase) des cellules Caco-2 (Rousset et al., 1985; Rousset et al., 1989). Cependant, certains effets n'étant pas mimés par l'analogue de l'AMPc, le dibutyryl AMPc, ils ont par la suite attribué les effets de la forskoline à des mécanismes AMPc-indépendants, mais dépendants de la PKC (Baricault et al., 1995; Sapin et al., 1997).

#### **4. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS**

Mes travaux de doctorat se divisent en trois volets. Dans un premier temps, les résultats obtenus jusqu'à présent dans la littérature nous avaient permis d'émettre l'hypothèse que la cascade MEK/ERK est nécessaire et suffisante à la prolifération des cellules épithéliales cryptales intestinales. Le premier objectif de mon projet de recherche était donc de déterminer si une activation soutenue de la cascade MEK/ERK est suffisante à la progression en phase G1 et à l'entrée en phase S du cycle cellulaire des cellules épithéliales cryptales intestinales.

Dans un deuxième temps, les études issues du laboratoire du Dr Rivard démontrant une localisation apicale des ERK dans les cellules épithéliales intestinales différenciées suggéraient que la cascade MEK/ERK joue également un rôle dans les cellules non-prolifératives différenciées, possiblement dans la dynamique des microvillosités. Pour appuyer cette deuxième hypothèse, mon objectif consistait à définir le rôle de la cascade MEK/ERK dans les cellules épithéliales intestinales différenciées.

Finalement, étant donné l'importance de la cascade AMPc/PKA dans la différenciation de certains types cellulaires et le peu de résultats répertoriés dans les cellules épithéliales intestinales, notre troisième hypothèse suggérait que la cascade AMPc/PKA module la différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines. Mon dernier objectif a donc été de clarifier les effets

d'une activation soutenue de la cascade AMPc/PKA sur la différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines.

## CHAPITRE II

### MATÉRIELS/MÉTHODES ET RÉSULTATS

#### **1. DUAL ROLE OF MEK/ERK SIGNALING IN SENESENCE AND TRANSFORMATION OF INTESTINAL EPITHELIAL CELLS**

Marie-Josée Boucher, Dominique Jean, Anne Vézina et Nathalie Rivard. (2003) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* SOUS PRESSE.

La cascade MEK/ERK agit en aval de Ras afin d'assurer le relai d'un signal de la surface cellulaire vers le noyau grâce à la translocation nucléaire des ERK1/2. Quelques études, dont les nôtres, ont montré que l'activation des ERK1/2 par les facteurs de croissance était nécessaire à la prolifération des cellules épithéliales cryptales intestinales. Cependant, il n'a pas été déterminé si l'activation seule de cette cascade est suffisante à induire la prolifération des cellules épithéliales intestinales. Dans ce but, des cellules normales épithéliales intestinales humaines (HIEC) et de rat (IEC-6) ont été infectées par des rétrovirus codant pour une forme sauvage de MEK1 (MEK WT) ou une forme constitutive active de MEK1 (MEK CA). **RÉSULTATS.** 1- L'expression stable d'une MEK CA, mais non d'une MEK WT, dans les cellules HIEC a mené à un arrêt permanent de la prolifération cellulaire (sénescence prématurée). Dans ces cellules HIEC-MEK CA, l'arrêt de la prolifération coïncide avec l'augmentation d'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire p21, p53 et p16<sup>INK4A</sup>. 2- À l'opposé, la sur-expression d'une

MEK CA dans les cellules IEC-6 a diminué la dépendance en agents mitogènes pour la prolifération, a mené à une transformation morphologique, a permis la croissance en agar mou et n'a pas influencé l'expression des inhibiteurs p21, p53 et p16<sup>INK4A</sup>. De plus, nous avons fourni certaines évidences que ERK1b, une isoforme issue de l'épissage alternatif de l'ARNm de ERK1, est activée et pourrait contribuer au non-arrêt de la prolifération à l'atteinte de la confluence et à la transformation des cellules IEC-6-MEK CA.

CONCLUSION. L'activation constitutive d'une MEK dans les cellules épithéliales intestinales peut mener à deux réponses cellulaires bien distincts, la sénescence prématurée ou la transformation, dépendamment de l'intégrité d'un programme de sénescence contrôlé par les inhibiteurs p21, p53 et p16<sup>INK4A</sup>.

Revised manuscript : G-00453-2003

## DUAL ROLE OF MEK/ERK SIGNALING IN SENESCENCE AND TRANSFORMATION OF INTESTINAL EPITHELIAL CELLS.

*Marie-Josée Boucher, Dominique Jean, Anne Vézina and Nathalie Rivard \**

CIHR Group on Functional Development and Physiopathology of the Digestive Tract,  
Département d'Anatomie et Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine,  
Université de Sherbrooke, Sherbrooke (Québec), J1H 5N4, Canada.

***Running title: ERK and intestinal epithelial cell senescence and transformation***

**Keywords :** ERK, intestinal epithelium, proliferation, cell cycle, senescence, transformation, p16<sup>INK4A</sup>, p53.

\* to whom correspondence should be sent:

Dr. Nathalie Rivard, Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine,  
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, J1H5N4, Canada.

Phone: (819) 564-5271

Fax : (819) 564-5320

e-mail:Nathalie.Rivard@USherbrooke.ca

## **ABSTRACT**

The Mitogen-Activated Protein Kinase cascade operates downstream of Ras to convey cell surface signals to the nucleus via nuclear translocation of ERK1 and ERK2. We and others have recently demonstrated that activation of ERK1/2 by growth factors is required for proliferation of intestinal epithelial crypt cells. However, it remained to be established whether ERK1/2 activation alone was sufficient to trigger intestinal epithelial cell proliferation. To this aim, retrovirus encoding the HA-tagged MEK1 wild type (wtMEK), the upstream activator of ERK1/2, or a constitutive active mutant of MEK1 (MEK1-S218D/S222D, caMEK) were used to infect non immortalized human normal intestinal epithelial crypt cell cultures (HIEC) and rodent immortalized intestinal crypt cells (IEC-6). **Results.** 1- Stable expression of caMEK, but not wtMEK, in HIEC led to the irreversible arrest of cellular proliferation (premature senescence). Concomitant with the onset of cell cycle arrest, was the induction of the cyclin-dependent kinase inhibitors p21<sup>Cip</sup>, p53 and p16<sup>INK4A</sup>. 2- By contrast, overexpression of caMEK in IEC-6 cells induced growth factor relaxation for DNA synthesis, promoted morphological transformation and growth in soft agar and did not affect expression of p21<sup>Cip</sup>, p53 and p16<sup>INK4A</sup>. We provided evidences that ERK1b, an alternatively spliced isoform of ERK1, is activated and may contribute to the deregulation of contact inhibition cell growth and transformation of these cells. **Conclusion.** Constitutive activation of MEK in intestinal epithelial cells can produce either premature senescence or forced mitogenesis depending on the integrity of a senescence program controlled by the cell cycle inhibitors p53, p16<sup>INK4A</sup> and p21<sup>CIP</sup>.

## **INTRODUCTION**

The human intestinal epithelium is in a constant state of self-renewal, with complete mucosal turnover occurring every 3-5 days. Intestinal epithelial cells are generated from a fixed stem-cell population functionally localized in the lower portion of the intestinal crypts, giving rise to four primary epithelial cell types : absorptive enterocytes, goblet cells, Paneth cells and enteroendocrine cells (5). The differentiation of each cell type takes place as cells move either upwards into the villus (absorptive, mucus and endocrine cells) or concentrate downwards at the bottom of the crypt (Paneth cells) (5). The mechanisms that direct these complex events and migration are most likely multiple and are currently poorly understood. Elucidation of these mechanisms would be invaluable not only in delineating normal cell processes leading to the differentiated phenotype but also in providing insight regarding abnormal processes, such as neoplasia formation, that can occur when these mechanisms go awry.

Mammalian cells express multiple mitogen-activated protein (MAP) kinases that mediate the effects of extracellular signals on a wide array of biological processes. Three distinct MAPK cascades have been described, all linked to separate signal transduction pathways resulting in the final activation of either Extracellular Signal Regulated Kinases (ERK) 1/2, p38  $\alpha/\beta/\delta/\gamma$ , or Jun kinases (JNKs) 1/2/3 (24). Depending on cellular context, extracellular signals are thought to elicit a specific cellular response (proliferation/differentiation/apoptosis) through the preferential activation of one of the MAPK cascades, all of which have distinct spectra of substrates (13).



In the majority of cell types, including intestinal epithelial crypt cells (2, 14, 30, 34, 53), mitogenic signals are relayed from the cytoplasm into the nucleus by nuclear translocation of the ubiquitously expressed ERK1 and ERK2, resulting in activation of a range of transcription factors such as Elk-1, c-Ets-1, and c-Ets-2 (60). The upstream activators of ERK1/2 (MEK1/2, Raf and Ras), on the other hand, remain cytoplasmic and/or membrane-bound (49, 61). Upon strong and persistent agonist stimulation, the ERK-mediated signals are attenuated and even terminated through various mechanisms, including the early induction of specific MAPK phosphatases (MKPs) (10, 49, 61).

In proliferation-prone cells, all components of the signal transduction cascade (Ras, Raf, MEK, ERK) are sequentially activated in response to serum growth factors. Ras has been shown to be crucial for cell proliferation since expression of permanently active forms of this protein triggers the cascade and leads to fibroblast (20, 33, 63, 69) and epithelial cell transformation (52, 66). This indicates that Ras activity is sufficient to bypass growth factor requirements. Although mutant Ras is most frequently associated with human epithelial cell-derived tumors (8), the majority of Ras signal transduction and transformation studies have been performed in rodent immortalized fibroblasts (6). In immortal rodent lines, transformation by oncogenic Ras involves its ability to bind and activate a series of effector proteins, including Raf-1, phosphatidyl inositol 3-kinase (PI-3K) and Ral.GDS (64, 65). Each of these proteins, in turn, activates distinct downstream targets, thereby producing different aspects of the transformed phenotypes. Although each of these effector pathways contribute to the transforming activity of Ras in immortal rodent fibroblasts, activation of the MAPK cascade is clearly sufficient (9, 12, 15, 39, 57). However, it has been previously reported that activated Raf-1, despite triggering constitutively elevated ERK1/2 activities, fails to cause morphologic and growth transformation

of immortal rat intestinal cells (RIE-1) (43). This observation could suggest that the relative contribution of ERK pathway to cell transformation may be determined by genetic background. However, blockade of the MEK/ERK cascade suppresses growth of colon tumors *in vivo*, suggesting that the ERK activation is indeed involved in intestinal tumor progression (55).

Virtually all studies examining MEK/ERK signaling in intestinal systems have utilized rodent immortal or human tumor-derived cell lines harboring unknown genetic alterations. Hence, the current study analyzed whether MEK/ERK activation alone is sufficient to trigger human cell proliferation and transformation, taking advantage of the recent generation of non immortalized human normal intestinal epithelial crypt cell cultures. The HIEC human diploid cell line, derived by Perreault and Beaulieu (46) from normal fetal (14 to 18 weeks of gestation) intestinal tissue, has a finite lifetime and thus provides a new avenue for investigating, in human cells, the potential implication of MEK/ERK signaling pathway in intestinal epithelial cell proliferation and transformation. The role of this pathway was also further investigated in IEC-6 cells, an established rat intestinal cell line that is immortalized but reported to display properties of normal epithelial cells (50, 53).

## **MATERIAL AND METHODS**

**Materials** : [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, [Methyl- $^3\text{H}$ ]-thymidine and the enhanced chemiluminescence (ECL) immunodetection system were obtained from Amersham-Pharmacia Biotech, (Baie d'Urfé, QC, Canada). Monoclonal antibodies against phosphorylated and active forms of ERK1/2 were from New England Biolabs (Mississauga, ON, Canada). Antibodies for the detection of cyclin D1/D2 (C-17), cyclin E (M-20), cdk4 (C-22), cdk2 (M2), p16<sup>INK4A</sup> (F-12), p27<sup>Kip1</sup> (C-19), p21<sup>Cip/Waf</sup> (C-19), p53 (DO-1), ERK1 (C-16) and HA tag were from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA). A second antibody for the detection of p16<sup>INK4A</sup> (Ab-8) was also used and purchased from Neomarkers (Fremont, ON, Canada). pRB antibody was obtained from Pharmingen (Mississauga, ON, Canada). The recombinant ERK2 protein was purchased from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). Secondary antibodies used in immunofluorescence were from Chemicon (Mississauga, ON, Canada) while antibodies used for Western blotting were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Insulin was from Connaught Novo Laboratories (Willowdale, ON, Canada). All other materials were obtained from Sigma-Aldrich unless stated otherwise.

**Cell Culture** : Non immortalized human intestinal epithelial cells (HIEC-6) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 4 mM glutamine, 20 mM HEPES, 50 U/ml penicillin, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin, 0.2 IU/ml insulin and 5% fetal bovine serum (FBS). HIEC cells were originally generated from normal fetal human small intestine at mid-gestation (46); they express typical features of the lower adult crypt region and appear unable to differentiate. The life span of this normal cell line

is limited to 22-25 passages. The rat intestinal epithelial crypt cell line IEC-6 (50) was obtained from A. Quaroni (Cornell University, Ithaca, NY) and cultured in plastic dishes in DMEM containing 5% FBS, as described previously (53).

***Virus production and retroviral infections :*** wtMEK and caMEK encoding cDNA were cloned after excision from pECE, filling with Klenow and sub-cloning blunt downstream of the CMV-promoter of retroviral vector pLXIN . wtMEK, caMEK- and empty pLXIN vectors were used to produce viruses in HEK293T cells in co-transfection with helper amphotropic DNA vector (pAmpho) (kindly provided by Dr C. Asselin, Université de Sherbrooke).  $5-8 \times 10^6$  cells were transfected 4 h by the lipofection method using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cell culture media (OptiMEM, Invitrogen) were collected 48 h after infection and filtered through Millex-HA filters (25 mm, 0.45  $\mu$ m; Millipore Corporation, Bedford, MA). Subconfluent HIEC cells were infected with the viral suspension containing 4  $\mu$ g/ml of polybrene (Hexadimethrine bromide H-9268, Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON) for 1 h under agitation at 37°C. The medium was then changed and selection for Geneticin (0.25 mg/ml; Bio Media Canada Inc, Drummondville, QC) resistance was applied 24 h later for 10-15 days in order to obtain stable populations. All experiments shown were performed within three weeks following selection.

***Protein Expression and Immunoblotting :*** Cells were lysed in sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2.3% SDS, 10% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.005% bromophenol blue). Proteins (10-50  $\mu$ g) from whole cell lysates were separated by SDS-PAGE in 7.5 or 10% gels. Proteins were detected immunologically following electrotransfer onto nitrocellulose membranes (Amersham-Pharmacia Biotech). Protein and molecular weight

markers (BioRad, Mississauga, ON, Canada) were revealed by Ponceau Red staining. Membranes were blocked in PBS containing 5% powdered milk and 0.05% Tween-20 for 1 h at 25°C. Membranes were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies in blocking solution, then with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit (1:1000) IgG for 1 h. Blots were visualized using the Amersham ECL system. Protein concentrations were measured using a modified Lowry procedure with bovine serum albumin as standard (47).

**DNA synthesis reinitiation :** Subconfluent IEC-6/pLXIN, IEC-6/wtMEK and IEC-6/caMEK cells were serum-starved for 48 h in DMEM. Cells were then stimulated for 16 h with 0.1, 0.5, 1 and 5% FBS in fresh DMEM medium. At the end of the incubation, 1  $\mu$ Ci of [methyl-<sup>3</sup>H]-thymidine was added for an additional 6 h. Cells were subsequently fixed and washed three times with ice-cold trichloroacetic acid (5%), harvested with 0.1 N NaOH and incorporated radioactivity counted.

**Growth assay :** All experiments were performed starting with HIEC and IEC-6 cell populations at 14 days post-selection and subsequently plated for growth assay in 12-well plates at a concentration of  $7.5 \times 10^4$  cells/well for HIEC and in 6-well plates at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells/well for IEC-6. Cell growth was measured after 5 days for HIEC cell populations and after 2, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 days for IEC-6 cell populations using a Cell particle counter.

**Soft-agar Growth assay :** Anchorage-independent growth was evaluated as described by Diaz et al. (18). Briefly, cells were plated at  $2 \times 10^5$  cells/well in complete DMEM containing 0.6% agar in 6-well plates. Medium was added (500  $\mu$ l/well) twice a week to maintain constant humidity.

After 16 days, colonies were photographed under light microscopy. Images of colonies were also taken after staining with MTT (0.5 mg/ml) for 3 h at 37°C.

***Electron Microscopy*** : Cell cultures were rinsed with PBS, pre-fixed for 15 min with a 1:1 mixture of culture medium (DMEM-BRL) and freshly prepared 2.8% glutaraldehyde in cacodylate buffer (0.1 M cacodylate-7.5% sucrose), then fixed for 30 min with 2.8% glutaraldehyde at room temperature. After two rinses, cultures were post-fixed for 60 min with 2% osmium tetroxide in cacodylate buffer. The cells were then dehydrated under increasing ethanol concentrations (40%, 70%, 90%, 95%, 100%, all 3 times each), then covered twice for 3 h with a thin layer of Araldite 502 resin (for ethanol substitution). Finally the resin was allowed to polymerize at 60°C for 48 h. Specimens were detached from the plastic vessels, inverted in embedding molds, covered with Araldite 502 and re-polymerized at 60°C for 48 h. Thin sections, prepared by ultramicrotomy, were contrasted with lead citrate and uranyl acetate, and observed in a blind fashion on a JEOL 100 CX transmission electron microscope. All reagents were purchased from Electron Microscopy Sciences (Cedarlane, Hornby, ON, Canada).

***Expression Vectors and Reporter Constructs*** : Plasmid thymidine-luciferase, which contains a high- affinity E2F binding site in the thymidine kinase promoter (16), was purchased from Clontech (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). The pRL-SV40 *Renilla* luciferase reporter vector was obtained from Promega (Nepean, ON, Canada). The expression vectors for HA-tagged MEK1 (wtMEK) and constitutively active MEK1 mutant (caMEK, in which the Raf1-dependent regulatory phosphorylation sites, S218 and S222, were substituted by aspartic residues) (12) were kindly provided by Dr J. Pouyssegur, Université de Nice, France. The HA-wtMEK and HA-caMEK were subcloned into the retroviral expression vector pLXIN (Clontech).

***Transient Transfections and Luciferase Assays.*** Subconfluent HIEC were seeded in 6-well plates and co-transfected by lipofection (Lipofectamine 2000, Invitrogen) with 0.1 µg of thymidine kinase-luciferase reporter, 0.25 µg of the relevant expression vector (pECE) containing the epitope-tagged hyperactivated MEK-1 (S218D/S222D) or wild-type MEK-1. The pRL-SV40 renilla luciferase vector (Promega, Nepean, ON, Canada) was used as a control for transfection efficiency. Luciferase activity was measured two days later according to the Promega protocol.

***Detection of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity:*** HIEC cells were infected with retrovirus encoding wtMEK or caMEK. Two weeks after selection, cells were seeded in 12-well plates. Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity was detected using a commercial kit from Cell Signaling (Cell Signaling Technology Inc., Mississauga, ON, Canada). Briefly, cells were fixed in 2% formaldehyde/0.2% glutaraldehyde. After washing, cells were incubated overnight in the staining solution (5mM potassium ferrocyanide, 5mM potassium ferricyanide, 1mg X-gal in dimethylformamide, 40mM citric acid pH6, 0.15M NaCl and 2mM MgCl<sub>2</sub>) at 37°C. Development of a blue color was visualized under a microscope.

***RT-PCR analysis :*** RNA was purified from cultured cells using the Trizol reagent (Invitrogen). For amplification starting from 5 µg of RNA as template, single-stranded cDNA was synthesized from total RNA using an oligo(dt) primer and reverse transcriptase AMV (Promega). Aliquots of the diluted cDNA preparations (5µl) were then used as templates for 100µl PCR reactions with the primers described by Yung et al. (68): ERK1-850-S: TACCTACAGTCTCTGCCCTCTAAA

and ERK1b-CT-AS: CTGGGGGCAAAGACAGT. Reactions were performed using 2.5 units of *Taq* polymerase (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Parameters for DNA amplification were 94°C for 30 s, annealing temperature (55°C) for 30 s, and 72°C for 30 s. Oligonucleotide primers used for DNA amplification were synthesized by Invitrogen. DNA amplification products were analyzed by gel electrophoresis on a polyacrylamide gel stained with ethidium bromide.

***Immunofluorescence Microscopy*** : HIEC cells grown on sterile glass coverslips were washed twice with ice-cold PBS. Cultures were then fixed in paraformaldehyde 3% for 15 min at room temperature, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min and blocked with PBS/BSA 2% (20 min at room temperature). Cells were immunostained for 1h with p16<sup>INK4A</sup> antibody followed by a 30-min incubation with FITC-conjugated secondary antibody, both at room temperature. Negative controls (no primary antibody) were included in all experiments. Quantification of cell fluorescence staining intensity was performed using the Metamorph Meta Imaging Series software v 5.0 (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA, USA).

***Data Presentation and Statistical Analysis***. Assays were performed in either duplicate or triplicate. Luciferase results were analyzed by the Student's *t* test and were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Typical Western blots shown are representative of 3 independent experiments. Densitometric analysis were performed by using Scion Image 4.02 (Scion Corporation, Frederick, MA, USA). Representative results of *in situ* indirect immunofluorescence from three independent experiments are shown.



## **RESULTS**

### **Stable expression of wtMEK and caMEK in HIEC and IEC-6 cells.**

The biological consequences of HA-tagged wtMEK and caMEK overexpression were examined in cultured human (HIEC) and rat (IEC-6) intestinal epithelial cells after viral infection of their respective cDNA cloned in the retroviral vector pLXIN. The percentage of retrovirally transduced cells ranged between 60% and 80%, as estimated by parallel infections using viruses expressing the *Green Fluorescent Protein* gene product. The pLXIN retroviral vector co-expressed a G418 resistance gene that allowed selection of pure populations of transduced cells within 10 days. As shown in Fig. 1A, the selected populations expressed a high level of HA-wtMEK and HA-caMEK, as determined by Western blot. Immunofluorescence studies confirmed that wtMEK and caMEK were cytoplasmic enzymes (data not shown).

We next compared the kinase activities of both wtMEK and caMEK. Exogenous MEK activities were measured following immunoprecipitation with antibodies against HA tag and using recombinant ERK2 protein as substrate. Fig. 1B shows that caMEK-expressing HIEC and IEC-6 cells exhibited approximately 30-fold more MEK activity when compared to wtMEK-expressing HIEC and IEC-6 cells after normalization of expression levels.

### **Effect of wtMEK and caMEK expression on HIEC and IEC-6 cell proliferation.**

HIEC and IEC-6 cells are highly dependent upon growth factor addition for reinitiation of DNA synthesis and cell proliferation. Therefore, expression of any active gene product that lies along the growth factor signaling pathway is expected to relax the growth factor requirement for DNA synthesis and cell proliferation. The proliferative properties of these cell populations were first monitored by growth curves. HIEC and IEC-6 cells transduced for wtMEK

or caMEK or empty vector (pLXIN) were plated at low density and cell numbers counted. As expected, control (pLXIN)- and wtMEK-expressing HIEC (Fig. 2A) cell populations grew steadily and reached confluence by day 5 post-seeding. By contrast, caMEK-expressing HIEC cells did not proliferate and stopped accumulating well before reaching confluence (Fig. 2A). In addition, the state of pRb hyperphosphorylation was also analyzed which, in the late G1 phase, is a landmark for cells passing the restriction point and entering S phase (41). In serum-deprived wtMEK-expressing HIEC, pRb was exclusively found in its hypophosphorylated state (Fig. 2B), while pRb inactivation (hyperphosphorylated form) became apparent 20 h after serum stimulation. In contrast, pRb hyperphosphorylation was never detected in caMEK-expressing HIEC cells indicating that these cells remained arrested in G0/G1 phase and thus did not progress into the cell cycle (Fig. 2B). To further evaluate the impact of strong activation of MEK/ERK signaling on HIEC cell proliferation, previously characterized expression constructs for wtMEK and caMEK were transiently transfected with a plasmid construction containing the E2F-responsive element of the thymidine kinase promoter linked to a luciferase reporter gene (see Methods) which represents a sensitive reporter of growth-factor induced cell cycle progression and S-phase entry (16). Ectopic expression of caMEK significantly inhibited *thymidine kinase* gene expression by 50% (Fig. 2C). In marked contrast, wtMEK expression had no significant effect on *thymidine kinase* expression when compared to controls (empty vector). Taken together these results indicate that strong and persistent activation of MEK/ERK signaling in non immortalized human intestinal crypt cells induces cell cycle arrest.

In IEC-6, there were no significant changes detected in the growth rate of caMEK-expressing cells when compared to pLXIN- and wtMEK-expressing cells during the initial exponential growth in medium containing 5% serum. However, a significant change in saturation density was clearly apparent in caMEK-expressing cells which continued to proliferate after

reaching confluency, in contrast to pLXIN- and wtMEK-expressing cells which became contact-inhibited at day 5 post-seeding (Fig. 2D). Moreover, there was no Rb phosphorylation detected in post-confluent pLXIN- and wtMEK-expressing cells indicating that these cells were contact-inhibited and arrested in G1 phase. By contrast, in the cell populations expressing caMEK, a significant proportion of cells were permanently cycling after confluency as judged by the detection of hyperphosphorylated pRb (Fig. 2E).

Constitutive active mutants of MEK1 have been reported to induce growth factor relaxation when expressed in immortalized fibroblasts (12). Therefore, dose-responses of FBS-induced reinitiation of DNA synthesis were consequently measured in populations of IEC-6 cells expressing pLXIN, wtMEK and caMEK. The serum dose-responses from G0-arrested pLXIN- and wtMEK-expressing cells were identical (data not shown). In marked contrast to wtMEK, expression of caMEK induced a growth factor-relaxation for DNA synthesis. Indeed, in cell populations expressing caMEK, a significant proportion of cells were permanently cycling in either total absence or in low concentrations of serum (0.1%) as judged by the high rates of thymidine incorporation (Fig. 2F). These results demonstrate that expression of a permanently active MEK is sufficient to disrupt growth control and allow autonomous cell cycling in immortalized intestinal epithelial crypt cells.

#### **Effect of wtMEK and caMEK expression on HIEC and IEC-6 cell morphology.**

Morphological examination of HIEC cells arrested by caMEK revealed that cells remained attached to the plates for at least one month (data no shown) and acquired a large and flat morphology (Fig. 3). These caMEK-expressing cells remained arrested in a metabolically active state for at least the duration of the observation period (>1month). No evidences of apoptosis (i.e. no observed cell detachment or nuclear fragmentation) was detected in caMEK-

expressing HIEC cells, 30 days after infection (data not shown). Moreover, these HIEC cells accumulated SA- $\beta$ -gal (Fig. 3, see arrows), a biomarker for senescent cells (19), demonstrating that constitutive activation of the MEK/ERK cascade in human intestinal crypt cells produces premature senescence.

Since caMEK-expressing IEC-6 cells were growth factor-relaxed, sensitivity of IEC-6 cells to transformation was determined by constitutively activated mutant of MEK. Few or no morphological changes were readily detectable in exponentially growing caMEK-expressing IEC-6 cells (data not shown). However, at higher cell densities, the caMEK-expressing cells formed foci in contrast to pLXIN- and wtMEK-expressing epithelioid cells (Fig. 4A, panels 1-3). The multi-layered morphology in caMEK-expressing cells became apparent at cell densities in which pLXIN- and wtMEK-expressing cells were forming a monolayer of contact-inhibited cells (Fig. 4B, panels 1 and 2). Furthermore, caMEK-expressing cells, but not wtMEK-expressing cells, showed the ability to form colonies in soft agar (Fig. 4C). These results indicate that constitutive activation of MEK1 in IEC-6 cells leads to morphological transformation.

#### **Effect of wtMEK and caMEK on endogenous ERK signaling.**

The consequences of stable expression of the active form of caMEK on activation of endogenous ERK were analyzed in resting and stimulated HIEC and IEC-6 cells. As shown in Fig. 5A and C (lanes 1-6), serum stimulation of HIEC and IEC-6 cells exhibited rapid and maximal activation of ERK1/2 within the 10 min and persisted for up to 2 h. Non stimulated caMEK-expressing HIEC (Fig. 5A, lane 7) and IEC-6 (Fig. 5C, lane 7) cells showed a moderate increased basal level of ERK1/2 activities when compared to pLXIN and wtMEK-expressing cells. However, little or no additional phosphorylation of ERK was detected upon serum

stimulation of caMEK-expressing HIEC and IEC-6 cells (Fig. 5A and 5C, lanes 7-9). These data indicate the possible induction of a feedback inhibition mechanism activated by caMEK in intestinal cells stimulated by growth factors, a phenomenon previously observed in rodent fibroblasts (11, 12, 15, 25).

The molecular manifestation of wild-type and activated MEK expression on ERK expression and activity was further analyzed in HIEC and IEC-6 cells cultured under normal conditions with 5% serum. As shown in Fig. 5B, caMEK-expressing HIEC cells consistently showed a slight increase in ERK1/2 activity levels (1.5-fold) in comparison to wtMEK-expressing cells. Expression of ERK proteins was similar in both HIEC cell populations (Fig. 5B). In IEC-6 cell populations, expression and activity of ERK1/2 remained unaffected in asynchronously growing and confluent pLXIN-, wtMEK- and caMEK-expressing cells (Fig. 5D). However, an additional species with low electrophoretic mobility was detected with the antibody recognizing the bi-phosphorylated and activated forms of ERK1/2 in all three IEC-6 cell populations (Fig. 5D, see arrowhead). Of note, this higher molecular mass form was prominent in confluent caMEK-expressing cells and appeared to correlate nicely with IEC-6 cell proliferation. Indeed, this band dramatically decreased as soon as pLXIN- and wtMEK-expressing cells reached confluence to almost undetectable levels in post-confluent G1 arrested cells.

In a recent study, Yung et al. (68) cloned a 46-kDa ERK isoform, termed ERK1b, which is an alternatively spliced form of ERK1, containing a 26-amino acid insertion between residues 340 and 341 of ERK1. Unlike the uniform pattern of expression of ERK1 and ERK2, ERK1b was confined to several tissues including heart, brain, lung and kidney. However, the expression of ERK1b in the intestinal epithelium still remained to be demonstrated. RT-PCR analysis was henceforth performed to evaluate ERK1 transcripts from rat intestinal mucosae and

from wtMEK- and caMEK-expressing IEC-6 cell lines. Fig. 5E illustrates the size of PCR products obtained with primers derived from the sequence of ERK1. Two amplified products were obtained: the expected 274 bp band (ERK1) and a second 352 bp band in intestinal mucosae as well as in IEC-6 cell populations, indicating that ERK1b was indeed expressed in intestinal epithelial cells. This suggests that the slower migrating form detected with the phospho-ERK antibodies (Fig. 5D, see arrowhead) may represent ERK1b. RT-PCR analysis demonstrates that neither wtMEK nor caMEK expression affected the expression of ERK1b (Fig. 5E). Taken together, our results demonstrate that, in contrast to ERK1 and ERK2, ERK1b phosphorylation levels are significantly enhanced in caMEK-expressing IEC-6 cells, suggesting that ERK1b could contribute to the deregulation of contact inhibition cell growth and transformation of these cells.

#### **Effect of wtMEK and caMEK on senescence-associated proteins and G1-phase regulatory proteins.**

Cellular senescence and transformation are normally accompanied by a series of changes that together distinguish senescence from quiescence or transformation. These changes involve altered expression of cell cycle proteins including up-regulation of p53, p21 and p16 for senescence (1, 4, 37, 42, 51, 56) and for intestinal cancer, up-regulation of cyclins and/or cyclin-dependent kinases (3, 45, 54, 58) and down-regulation of p27<sup>Kip1</sup> (38, 59). Interestingly, caMEK induced p53 (about 4-fold induction), p21 (about 3.3-fold induction) and p16 (about 3.7-fold induction) expression in HIEC cells (Fig. 6A). It should be noted that these effects require constitutive active MEK activation, since HIEC cells overexpressing a wild-type MEK allele grow normally and display normal low levels of p53, p21 and p16. These results confirm that the cell-cycle arrest produced by activated MEK is characteristic of cellular senescence. In contrast to HIEC, there were no significant differences in expression levels of p21 in IEC-6 cells

expressing wtMEK or caMEK; however, after densitometric analyses, we found a modest decrease (around 30%) in p53 protein levels in caMEK-expressing cells (Fig. 6A). Finally, Western blot analysis using two different antibodies failed to detect p16 protein in wtMEK- and caMEK-expressing IEC-6 cells as well as in parental IEC-6 cell line (data not shown).

While stable expression of caMEK provoked cell cycle arrest and senescence in HIEC cells, it otherwise promoted IEC-6 cell proliferation and transformation. Indeed, in IEC-6 cell populations expressing caMEK, a significant proportion of cells were permanently cycling after confluency (see Fig. 2D and 2E). In a first attempt to identify the “cooperating” factors that might be responsible for deregulating proliferation of caMEK-expressing IEC-6 cells, we analyzed the expression of cyclin D1, cyclin E, cdk4, and cdk2 because the progression through the G1 phase and the G1/S phase transition are orchestrated by cyclin D/Cdk4,6 and cyclin E/Cdk2 complexes. As shown in Fig. 6B, cyclin D1, cdk2, and cdk4 proteins were significantly induced by approximately 2-fold ( $n=3$ ) in caMEK-expressing IEC-6 cells after confluency (occurring at day 5 post-seeding) comparatively to wtMEK-expressing cells. No significant modulation of cyclin E expression was found however. We also analyzed p27<sup>Kip1</sup> expression which is known to play a pivotal role in the G1-to-S phase transition and which is also involved in growth arrest in response to cell-cell contact in various cell types (48), including IEC-6 and HIEC cells (17, 53). As shown in Fig. 6B, p27<sup>Kip1</sup> expression was induced as soon as wtMEK-expressing cells reached confluence (day 5 post-seeding), an expression that progressively increased during post-confluence. By contrast, expression of p27<sup>Kip1</sup> was attenuated by around 39% at day 5 post-seeding and by 80% at day 20 post-seeding in caMEK-expressing cells compared to wtMEK-expressing cells. Finally, with the exception of cyclin D1, cdk4, cdk2 and p27<sup>Kip1</sup>, we did not observe any difference in expression levels of other cell-cycle regulatory proteins including E2F1, E2F4, p107Rb and p130Rb (data not shown).

## **DISCUSSION**

It has been previously demonstrated that activation of the MEK>ERK pathway is required for S phase entry (2), p27<sup>Kip1</sup> down-regulation (53) and proliferation (14, 30, 34, 53) of intestinal epithelial cells. Herein, we describe the consequences of stable expression of constitutively active MEK1 mutant on growth factor-dependent signaling events in immortalized (IEC-6) and non immortalized (HIEC) intestinal epithelial cells. Firstly, expression of the constitutively active form of MEK1 induced senescence in non immortalized human intestinal cells whereas it was found to be sufficient to mimic growth factor signals and to deregulate growth control of immortal rodent IEC-6 cells. These conclusions are based on the fact that expression of caMEK 1- inhibited HIEC cell proliferation but induced growth factor relaxation for DNA synthesis in IEC-6 cells; 2- prevented cell cycle entry (e.g. hyperphosphorylation of pRb; thymidine kinase gene expression) of HIEC in response to serum but was sufficient for cell cycle progression in an IEC-6 cell population deprived of growth factors; 3- induced the accumulation of SA- $\beta$ -galactosidase, a biomarker for senescent cells, in HIEC but promoted morphological transformation and growth in soft agar in IEC-6 cells; and 4- enhanced the expression levels of cell cycle inhibitors p21, p53 and p16 in HIEC but not in IEC-6 cells.

The results presented herewith clearly demonstrate that MEK activation can produce two precisely opposite outcomes in intestinal epithelial cells : cell cycle arrest or forced mitogenesis. This may be dependent on the integrity of the senescence program controlled by p21 and mostly by p53 and p16. It has recently been shown that oncogenic Ras requires immortalizing changes to promote oncogenic transformation (37, 56). Indeed, because immortal



rodent cell lines have already lost aspects of the senescence program, they are transformed by oncogenic Ras alone (56). Recently, Lin et al. (37) have demonstrated that constitutive activation of MEK1 arrests primary murine fibroblasts but forces uncontrolled mitogenesis and transformation in cells lacking p53 or p16. The present data are in total agreement with these studies performed in fibroblasts. Indeed, expression of activated MEK in non immortalized intestinal epithelial cells (HIEC) resulted in induced expression of p21, p53 and p16 and in senescence whereas expression of the same mutant in rodent immortalized IEC-6 cells resulted in growth factor relaxation and transformation. No induction of p21 and p53 expression was observed by activated MEK and we were unable to detect p16 expression in IEC-6 cells with two different antibodies. The failure to detect p16 expression in IEC-6 cells is not surprising since it has been reported that several non-tumorigenic immortalized cell lines also lack functional p16 protein (29, 51). In fact, its silencing is now recognized as the second most common molecular defect in immortalization and cancer (27). The *Ink4a/Arf* locus which encodes the tumor suppressors p16<sup>Ink4a</sup> (p16) and p14<sup>Arf</sup> (Arf) (the mouse homologue is called p19<sup>ARF</sup>) is often methylated in a broad range of common human solid tumors, including carcinomas of the colon and breast. A considerable body of circumstantial evidence supports the notion that such methylation is relatively specific and results in functionally significant gene inactivation. Recently, it has been demonstrated that *p16<sup>INK4A</sup>* methylation exists in the immortal IEC-18 cell line, an intestinal epithelial cell line close to IEC-6 cell line (26). In addition to methylation, frequent point mutations of p16 and homozygous deletion of the locus were noted in a variety a tumor cell lines (31). p53 protein levels were barely detected in either control, wtMEK-expressing and caMEK-expressing IEC-6 cells. Moucadel et al. (40) recently reported that p53 is active in IEC-6 cells. Under normal cell conditions, p53 is maintained at low levels because it has a very short half-life. However, in the presence of DNA damage or oncogenic stresses, p53

accumulates rapidly through post-transcriptional mechanisms and gains full potential as a transcriptional activator (56). It has been shown that abnormal proliferation induced by oncogenes such as Ras results in deregulated E2F1 activity which induces ARF expression. This ARF expression in turn stabilizes p53 and leads to cell-cycle arrest or apoptosis unless there is occurrence of a second lesion such as a mutation in ARF itself or p53 (7, 44). Methylation of the p16 and/or Arf promoters in the *Ink4a/Arf* locus has been found in about one-half of colon carcinomas and adenomas (26), suggesting that the locus may suppress early stages of development of this tumor type. Furthermore, it has been reported that ARF is epigenetically inactivated in several colorectal cell lines and its expression is restored by treatment with demethylating agents (22). Therefore, one could speculate that the failure to induce p19<sup>ARF</sup> expression in caMEK-expressing IEC-6 cells may explain the failure to induce p53. Restriction digesting-based methylation analysis and methylation-specific PCR are required to determine the methylation status of the p16 and ARF promoters in IEC-6 cells. Therefore, our results confirm the view that premature senescence may act as a fail-safe mechanism to limit the transforming potential of excessive Ras/MAPK signaling not only in fibroblasts but also in epithelial cells, the same cell type from which the majority of Ras mutation positive cancers arise (8).

In a first attempt to identify the factors possibly responsible for deregulating proliferation of IEC-6 cells expressing activated MEK1, we have analyzed the expression of other cell cycle regulatory proteins and we found an up-regulation of cyclin D1, cdk4 and cdk2 expression and a strong reduction of p27<sup>Kip1</sup> levels in caMEK-expressing cells. Abnormalities in the expression of these cell cycle regulatory proteins have been previously reported in tumors of the small bowel (3) and colorectal carcinoma (38, 45, 54, 58, 59). Regarding p27<sup>Kip1</sup>, the result is in agreement with our previous data showing that MEK/ERK cascade is required for p27 down-

regulation and S phase entry in fibroblasts and IEC-6 cells (53). Moreover, it has been reported that reduced expression of p27<sup>Kip1</sup> is a predictive factor of a poor prognosis for patients with breast and colorectal cancers (38, 59). Taken together, it is therefore likely that up-regulation of cyclin D1, cdk4 and cdk2 expression, reduction of p27<sup>Kip1</sup> levels and the non-induction of p16, p21 and p53 in caMEK-expressing cells may all contribute in maintaining a significant proportion of pRb in an hyperphosphorylated state after confluency. These actions are complementary since they all cooperate towards the induction of cyclin-dependent kinases and in the stimulation of cell proliferation.

It was previously reported that, while necessary for Ras transformation, Raf/ERK cascade alone is not sufficient to cause transformation of RIE-1, an immortalized rat intestinal epithelial cell line (43). This observation could suggest that the relative contribution of ERK pathway to cell transformation may be determined by genetic background. However, blockade of MEK by the highly potent and selective inhibitor of MEK, PD184352, suppresses growth of colon tumors *in vivo*, suggesting that the MEK activation is indeed involved in intestinal tumor progression (55). While some studies have reported that ERK1/2 activities are elevated in intestinal tumors (28, 35, 36), others have shown no modulation or inhibition (21, 62). In the present study, basal activity of ERK1/2 was slightly to moderately enhanced in both cell populations expressing the activated form of MEK1 (caMEK). However, stimulation of ERK activities in response to serum was not observed in either cell populations expressing caMEK. One plausible explanation is that cells permanently stimulated by autoactive MEK1 are desensitized *via* multiple mechanisms including the previously reported ERK-mediated feedback inhibition of MEK (11) and possible increased basal levels of MAPK phosphatase (10, 25, 49). Our preliminary results indicate that the MKP-1, MKP-2 and MKP-3 are not induced in caMEK-

expressing cells. Hence, an alternative and yet unknown MAPK phosphatase is likely responsible for the prevention of ERK induction by serum growth factors in our cells. A plausible candidate is PTP-ER (closely related to PTP-SL) which was found to play a key role in Ras1 signaling in *Drosophila* (32). It should be noted, however, that transduction of activated MEK in IEC-6 cells did not initially enhance ERK1 and ERK2 activities in presence of serum, although after 5-6 weeks, these cells had elevated ERK1/2 activities as well as a slightly more refractile and fibroblastic appearance (data not shown). These disparate observations suggest that selective pressures rather than direct signaling may determine the level of ERK activity in transformed cells and that these selective pressures may vary depending on cellular and genetic backgrounds.

In our view, the most interesting and novel finding of this study is the detection, by the antibody recognizing phosphorylated and activated forms of ERK, of a band with a molecular mass of 46 kDa in our IEC-6 cell populations. We believe that this 46-kDa band is in fact ERK1b, an alternatively spliced isoform of ERK1 which has recently been cloned and characterized by the group of Seger et al. (67, 68) since: 1- RT-PCR analyses performed with specific primers derived from the sequence of ERK1 and also used by Seger's group (68) revealed the expression of a ERK1b transcript (352 pb) in intestinal epithelium and IEC-6 cell lines; 2- under most circumstances, the kinetics of phosphorylation (activation) of this 46-kDa was similar to ERK1 and ERK2 (see in serum-stimulated cells and in asynchronously growing cells); and 3- phosphorylation levels of the 46-kDa band were markedly enhanced in IEC-6 cells expressing the constitutive activated mutant form of MEK1. Finally, as previously reported (68), the 46-kDa band was also recognized by Abs directed against the C terminus of ERK1 (weaker staining, see Fig. 5D).

Of particular note is that phosphorylation levels of ERK1b appeared to correlate very closely with IEC-6 cell proliferation. Indeed, in contrast to ERK1 and ERK2, ERK1b activity dramatically decreased as soon as pLXIN- and wtMEK-expressing cells reached confluence, to almost undetectable levels in post-confluent G1 arrested cells. In addition, ERK1b was prominent in confluent caMEK-expressing cells which continued to proliferate well after confluence, indicating that ERK1b may contribute to the deregulation of contact inhibition cell growth and transformation of IEC-6 cells. Hence, it appears that in IEC-6 cells (Fig. 5D) as well as in other transformed cells (25), constitutive activation of the upstream components of the ERK cascade is not accompanied by a comparable activation of ERK1 and ERK2, at least initially. This suggests that these two latter isoforms may be under tight down-regulation. However, ERK1b appears to escape this tight down-regulation in IEC-6 cells and appears to be the major responsive ERK isoform. Interestingly, in Ras-transformed Rat1 cells, there was higher expression of ERK1b, which was also more responsive than ERK1 and ERK2 to various extracellular treatments in transformed cells (68). These observations are consistent with the fact that ERK1b is less sensitive to phosphatases (67). Hence, ERK1b may transmit exogenous signal under conditions where ERK1 and ERK2 are down-regulated upon persistent stimulation.

Unfortunately, our RT-PCR and Western blot analysis never permitted to detect Erk1b expression in HIEC cells. Seger's group has already reported that this ERK isoform is abundant mainly in rat tissues, and much lesser amounts were detected in humans (68). Furthermore, expression of Erk1b protein was reported only in cancer cells and never in normal human cells. Nevertheless, we predict that even if Erk1b is stimulated by constitutive active MEK in these cells, G1 arrest will still occur because integrity of the HIEC senescence program remains intact (up-regulation of p53 and p16 expression will still occur).

In summary, our data demonstrate that the constitutive activation of MEK in intestinal epithelial cells can produce either premature senescence or forced mitogenesis depending on the integrity of the senescence program controlled by p53 and p16. In this view, mutations that deregulate the MAPK cascade provide an initial proliferative advantage but also accelerate senescence. However, cells acquiring mutations in *p53* or at the *INK4A/ARF* locus escape senescence, thereby revealing the full mitogenic potential of the MAPK cascade. Consistent with this scenario, ras mutations often precede mutations in p53 or INK4A during tumor development (23). Finally, our findings are consistent with ERK1b being the major ERK isoform that mediates MEK1-induced intestinal epithelial cell transformation.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Pierre Pothier for the critical reading of the manuscript. This research was supported by Canadian Institutes of Health Research Grants (MT-14405 and GR-15186). NR is a recipient of a Canadian Research Chair in Signaling and Digestive Physiopathology. MJB is a student scholar from the Fonds pour la Recherche en Santé du Québec.

## **REFERENCES**

1. **Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, and Barrett JC.** Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13742-13747, 1996.
2. **Aliaga JC, Deschênes C, Beaulieu JF, Calvo EL, and Rivard N.** Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 277:G631-G641, 1999.
3. **Arber N, Hibshoosh H, Yasui W, Neugut AI, Hibshoosh A, Yao Y, Sgambato A, Yamamoto H, Shapira I, Rosenman D, Fabian I, Weins I, Tahara E, and Holt PR.** Abnormalities in the expression of cell cycle-regulated proteins in tumors of the small bowel. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8:1101-1105, 1999.
4. **Atadja P, Wong H, Garkavtsev I, Veillette C, and Riabowol K.** Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8348-8352, 1995.
5. **Babyatsky MW, and Podolsky DK.** *Growth and development of the gastrointestinal tract*. Philadelphia: JB Lippincott, 1999, p. 547-584.
6. **Barbacid M.** Ras genes. *Annu Rev Biochem* 56:779-827, 1987.
7. **Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, and Vousden KH.** p14<sup>ARF</sup> links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395:124-125, 1998.
8. **Bos JL.** The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat Res* 195:255-271, 1988.
9. **Bottorff D, Stang S, Agellon S, and Stone JC.** RAS signalling is abnormal in a c-rafl MEK1 double mutant. *Mol Cell Biol* 15: 5113-5122, 1995.



10. Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J, and McKenzie FR. The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. *J Biol Chem* 272:1368-1376, 1997.
11. Brunet A, Pagès G, and Pouyssegur J. Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1). *FEBS Lett* 346:299-303, 1994.
12. Brunet A, Pagès G, and Pouyssegur J. Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts. *Oncogene* 9:3379-3387, 1994.
13. Chang L, and Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 410:37-40, 2001.
14. Chiu T, Wu SS, Santiskulvong C, Tangkijvanich P, Yee HF Jr, and Rozengurt E. Vasopressin-mediated mitogenic signaling in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C434-450, 2002.
15. Cowley S, Paterson H, Kemp P, and Marshall CJ. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77:841-852, 1994.
16. DeGregori J, Kowalik T, and Nevins JR. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol* 15:4215-4224, 1995.
17. Deschênes C, Vézina A, Beaulieu JF, and Rivard N. Role of p27Kip1 in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* 120:423-438, 2001.

18. **Diaz VM, Planaguma J, Thomson TM, Reventos J, and Paciucci R.** Tissue plasminogen activator is required for the growth, invasion, and angiogenesis of pancreatic tumor cells. *Gastroenterology* 122:806-819, 2002.
19. **Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, and Pereira-Smith O.** A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9363-9367, 1995.
20. **Dotto GP, Parada LF, and Weinberg RA.** Specific growth response of ras-transformed embryo fibroblasts to tumor promoters. *Nature* 318:472-475, 1985.
21. **Eggstein S, Franke M, Kutschka I, Manthey G, von Specht BU, Ruf G, and Farthman EH.** Expression and activity of mitogen-activated protein kinases in human colorectal carcinoma. *Gut* 44:834-838, 1999.
22. **Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, and Herman JG.** Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 60:129-133, 2000.
23. **Fearon ER, and Vogelstein B.** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767, 1990.
24. **Garrington TP, and Johnson GL.** Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11:211-218, 1999.
25. **Gopalbhai K, and Meloche S.** Repression of mitogen-activated protein kinases ERK1/ERK2 activity by a protein tyrosine phosphatase in rat fibroblasts transformed by upstream oncoproteins. *J Cell Physiol* 174:35-47, 1998.
26. **Guan RJ, Fu Y, Holt PR, and Pardee AB.** Association of K-ras mutations with p16 methylation in human colon cancer. *Gastroenterology* 116:1063-1071, 1999.

27. Hirama T, and Koeffler HP. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 86:841-854, 1995.
28. Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, Tsuruo T, Oka H, Yoshida O, Shimada Y, Ari-i S, Wada H, Fujimoto J, and Kohno M. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18:813-822, 1999.
29. Huschtscha LI, and Reddel RR. p16INK4A and the control of cellular proliferative life span. *Carcinogenesis* 20:921-926, 1999.
30. Jasleen J, Shimoda N, Shen ER, Tavakkolizadeh A, Whang EE, Jacobs DO, Zinner MJ, and Ashley SW. Signaling mechanisms of glucagon-like peptide 2-induced intestinal epithelial cell proliferation. *J Surg Res* 90:13-18, 2000.
31. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitgian SV, Stockert E, Day RS III, Johnson BE, and Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264:436-440, 1994.
32. Karim FD, and Rubin GM. PTP-ER, a novel tyrosine phosphatase, functions downstream of Ras1 to downregulate MAP kinase during *Drosophila* eye development. *Mol Cell* 3:741-50, 1999.
33. Land H, Chen AC, Morgenstern JP, Parada LF, and Weinberg RA. Behavior of myc and ras oncogenes in transformation of rat embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* 6:1917-1925, 1986.
34. Li W, Duzgun A, Sumpio BE, and Basson MD. Integrin and FAK-mediated MAPK activation is required for cyclic strain mitogenic effects in Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G75-G87, 2001.

- 35. Licato LL, and Brenner DA.** Analysis of signaling protein kinases in human colon or colorectal carcinomas. *Dig Dis Sci* 43:1454-1464, 1998.
- 36. Licato LL, Keku TO, Wurzelmann JI, Murray SC, Woosley JT, Sandler RS, and Brenner DA.** In vivo activation of mitogen-activated protein kinases in rat intestinal neoplasia. *Gastroenterology* 113:1589-1598, 1997.
- 37. Lin AW, Barradas M, Stone JC, Van Aelst L, Serrano M, and Lowe SW.** Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive active MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* 12:3008-3019, 1998.
- 38. Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, and Pagano M.** Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Med* 3: 152-154, 1997.
- 39. Mansour, SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, and Ahn NG.** Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* 265:966-970, 1994.
- 40. Moucadel V, Totaro MS, Dell CD, Soubeyran P, Dagorn JC, Freund JN, and Iovanna JL.** The homeobox gene Cdx1 belongs to the p53-p21(WAF)-Bcl-2 network in intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 297:607-615, 2002.
- 41. Mulligan G, and Jacks T.** The retinoblastoma gene family : cousins with overlapping interests. *Trends Genet* 14:223-229, 1998.
- 42. Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, and Smith JR.** Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 211:90-98, 1994.

- 43. Oldham SM, Clark GJ, Gangarosa LM, Coffey RJ Jr, and Der CJ.** Activation of the Raf-1/MAP kinase cascade is not sufficient for Ras transformation of RIE-1 epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6924-6928, 1996.
- 44. Palmero I, Pantoja C, and Serrano M.** p19<sup>ARF</sup> links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* 395:125-126, 1998.
- 45. Palmqvist R, Stenling R, Oberg A, and Landberg G.** Expression of cyclin D1 and retinoblastoma protein in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 34:1575-1581, 1998.
- 46. Perreault N, and Beaulieu JF.** Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human intestinal epithelial cell cultures. *Exp Cell Res* 224:354-364, 1996.
- 47. Peterson GL.** A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346-356, 1977.
- 48. Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, and Koff A.** p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8:9-22, 1994.
- 49. Pouyssegur J, Volmat V, and Lenormand P.** Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochemical Pharmacol* 64:755-763, 2002.
- 50. Quaroni A, Wands J, Trelstad RL, and Isselbacher KJ.** Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol* 80:248-265, 1979.
- 51. Reznikoff CA, Yeager TR, Belair CD, Savelieva E, Puthenveetil JA, and Stadler WM.** Elevated p16 at senescence and loss of p16 at immortalization in human papillomavirus 16 E6, but not E7, transformed human uroepithelial cells. *Cancer Res* 56:2886-2890, 1996.

- 52. Rhim JS.** Neoplastic transformation of human epithelial cells in vitro. *Anticancer Res* 9:1345-1365, 1989.
- 53. Rivard N, Boucher MJ, Asselin C, and L'Allemain G.** MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 277:C652-C664, 1999.
- 54. Sahl B, Bergman D, Marotta A, and Pelech SL.** Differential cyclin-dependent kinase expression and activation in human colon cancer. *Anticancer Res* 19:741-748, 1999.
- 55. Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, Van Becelaere K, Wiland A, Gowan RC, Tecle H, Barrett SD, Bridges A, Przybranowski S, Leopold WR, and Saltiel AR.** Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nature Med* 5:810-816, 1999.
- 56. Serrano M, Lin, AW, McCurrach ME, Beach D, and Lowe SW.** Oncogenic ras provokes premature senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4A. *Cell* 88:593-602, 1997.
- 57. Stang S, Bottorff D, and Stone JC.** Interaction of activated Ras with Raf-1 alone may be sufficient for transformation of rat2 cells. *Mol Cell Biol* 17:3047-3055, 1997.
- 58. Sutter T, Dansranjav T, Lubinski J, Debniak T, Giannakudis J, Hoang-Vu C, and Dralle H.** Overexpression of cyclin E protein is closely related to the mutator phenotype of colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis* 17:374-380, 2002.
- 59. Thomas GV, Szigeti K, Murphy M, Draetta G, Pagano M, and Loda M.** Down-regulation of p27 is associated with development of colorectal adenocarcinoma metastases. *Am J Pathol* 153: 681-687, 1998.
- 60. Treisman R.** Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 8:205-215, 1996.

- 61. Volmat V, Camps M, Arkinstall S, Pouyssegur J, and Lenormand P.** The nucleus, a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases. *J Cell Sci* 114:3433-43, 2001.
- 62. Wang Q, Ding Q, Dong Z, Ehlers RA, and Evers BM.** Downregulation of mitogen-activated protein kinases in human colon cancers. *Anticancer Res* 20:75-83, 2000.
- 63. Weber MJ.** Raffling off the effectors of Ras. *Cancer Biol Ther* 2:76-77, 2003.
- 64. White MA, Nicolette C, Minden A, Polverino A, Van Aelst L, Karin M, and Wigler MH.** Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. *Cell* 80:533-541, 1995.
- 65. White MA, Vale T, Camonis JH, Schaefer E, and Wigler MH.** A role of Ral1 guanine nucleotide dissociation stimulator in mediating Ras-induced transformation. *J Biol Chem* 271:16439-16442, 1996.
- 66. Yoakum GH, Lechner JF, Gabrielson EW, Korba BE, Malan-Shibley L, Willey JC, Valerio MG, Shamsuddin AM, Trump BF, and Harris CC.** Transformation of human bronchial epithelial cells transfected by Harvey ras oncogene. *Science* 227:1174-1179, 1985.
- 67. Yung Y, Yao Z, Aebersold DM, Hanoch T, and Seger R.** Altered regulation of ERK1b by MEK1 and PTP-SL and modified Elk1 phosphorylation by ERK1b are caused by abrogation of the regulatory C-terminal sequence of ERKs. *J Biol Chem* 276:35280-35289, 2001.
- 68. Yung Y, Yao Z, Hanoch T, and Seger R.** ERK1b, a 46-kDa ERK isoform that is differentially regulated by MEK. *J Biol Chem* 275:15799-15808, 2000.
- 69. Zavada J, and Macpherson I.** Transformation of hamster cell lines in vitro by a hamster sarcoma virus. *Nature* 225:24-26, 1970.

## **Figure legends**

### **Figure 1 : Expression and kinase activity of wtMEK and caMEK in HIEC and IEC-6 cells.**

HIEC and IEC-6 cell populations stably expressing pLXIN, wtMEK or caMEK were harvested 2 weeks post-selection. **A.** Equal amounts of whole cell lysates were separated by 10 % SDS-PAGE, and proteins analyzed by Western blotting with specific antibodies to HA tag. **B.** Cell extracts (400 µg) were immunoprecipitated with a specific antibody to HA. Levels of immunoprecipitated HA-wtMEK or HA-caMEK were analyzed by Western blotting. Kinase activity of HA-wtMEK and HA-caMEK is demonstrated by the phosphorylation of recombinant ERK2.

### **Figure 2 : Effect of wtMEK and caMEK expression on HIEC and IEC-6 cell proliferation.**

**A and D.** Cells were cultured as described in Methods for 5 (HIEC) or 2, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 days (IEC-6) and cell growth measured by cell counting. Values are the means  $\pm$  S.E. of three separate experiments performed in quadruplicate. **B.** HIEC cell populations were serum-starved for 36 h, then stimulated with 5% FBS for 4 and 20 h. Equal amounts of whole cell lysates were separated by 7.5% SDS-PAGE, and proteins analyzed by Western blotting with specific antibodies to pRb (Rb-P : hyperphosphorylated Rb). **C.** Subconfluent HIEC were co-transfected with 0.1 µg of thymidine kinase-luciferase, 0.25 µg of the relevant expression vector (pECE) in the presence or absence of wtMEK or caMEK. Luciferase activity was measured 48 h thereafter according to the Promega protocol. The increase in luciferase activity was calculated relative to control levels of thymidine kinase-luciferase obtained in pECE-transfected cells, which was set at 1. Results are the mean  $\pm$  SE of at least 3 separate experiments. \*Significantly different from



control (pECE) at  $p < 0.05$  (Student  $t$  test). **E.** IEC-6 cell populations were harvested 2, 5, 15, 20 days after seeding. Cell extracts (60  $\mu$ g) were separated by 7.5% SDS-PAGE, and proteins analysed by Western blotting for pRb expression. **F.** Reinitiation of DNA synthesis in response to increasing concentrations of FBS was measured as described in Methods. Each point represents the mean of triplicate values. Results are expressed as fold stimulation of thymidine incorporation obtained with 0% FBS in wtMEK-expressing cells.

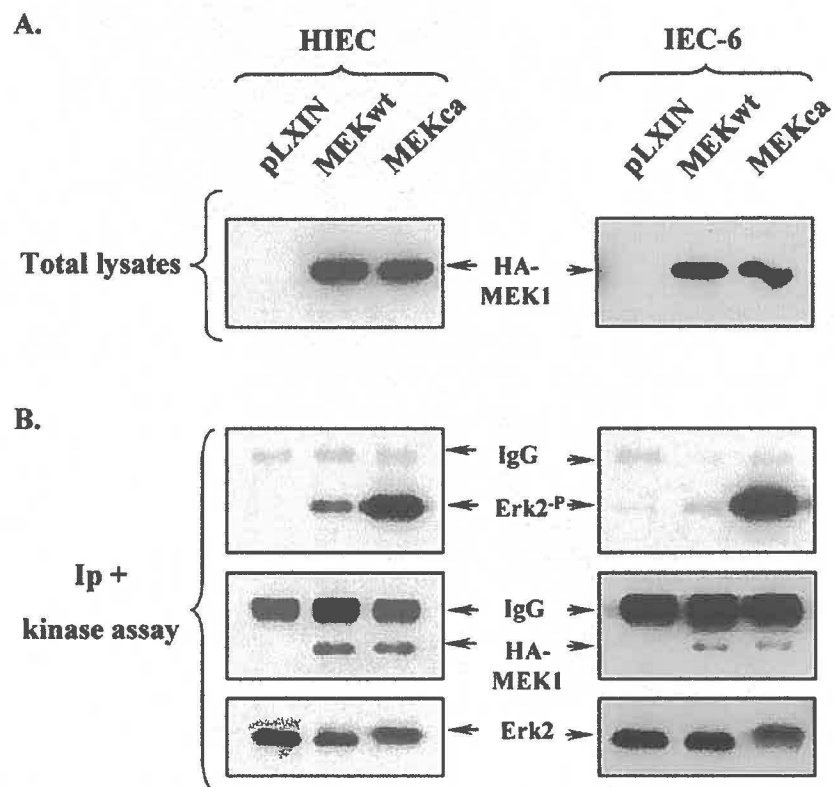
**Figure 3 : Effect of wtMEK and caMEK expression on HIEC cell morphology.** Photomicrographs of HIEC cell populations containing wtMEK (panels 1-2) or caMEK (panels 3-4) stained for SA- $\beta$ -galactosidase activity (pH 6.0) at day 14 post-selection. Arrows indicate accumulated SA- $\beta$ -galactosidase. Bars: 25  $\mu$ M.

**Figure 4 : Effect of wtMEK and caMEK expression on IEC-6 cell morphology and transformation. A. Panels 1-3.** Representative phase/contrast pictures of 10-day post-confluent wtMEK- and caMEK-expressing cells. Bars : 25  $\mu$ M. **B. Panels 1 and 2.** 15-day post-confluent wtMEK- and caMEK-expressing IEC-6 cells were fixed in glutaraldehyde and osmium tetroxide before epoxy-embedding for electronic microscopy analysis. Magnification : 2800X. **C.** wtMEK- and caMEK-expressing cells were seeded in growth medium containing 0.6% agar during 16 days. **Panels 1 and 2.** Colonies were photographed under light microscopy. **Panels 3 and 4.** Images of colonies were also taken after staining with MTT (0.5mg/ml).

**Figure 5 : Effect of wtMEK and caMEK on endogenous ERK signaling. A and C.** HIEC and IEC-6 cells stably expressing wtMEK or caMEK were serum-starved for 36 h, then stimulated

with or without (0) 5% FBS for 10 min and 2 h. **B.** Cell lysates were prepared from asynchronously HIEC cells stably expressing wtMEK and caMEK. **D.** IEC-6 cells stably expressing pLXIN, wtMEK and caMEK were harvested 2, 5 (confluence), 15 and 20 days after seeding. **A-D.** Equal amounts of whole cell lysates were separated by SDS-PAGE, and proteins electrotransferred onto nitrocellulose. Western blot analysis for active ERK1/2 activities and total ERK1/2 proteins was performed as described in Methods. Arrowhead indicates an additional species with low electrophoretic mobility that could correspond to ERK1b. **E. Lane 1 :** PCR analysis was performed (without reverse transcriptase) with the oligonucleotide primers ERK1-850-S and ERK1-CT-AS and total RNA from intestinal mucosae as template. **Lanes 2-4 :** RT-PCR analysis was performed with the oligonucleotide primers ERK1-850-S and ERK1-CT-AS and total RNA from IEC-6 cells expressing wtMEK and caMEK as well from intestinal mucosae as templates.

**Figure 6 : Effect of wtMEK and caMEK on senescence-associated proteins and G1-phase regulatory proteins. A. Western blot analysis :** Cell extracts were prepared from HIEC and IEC-6 cells stably expressing wtMEK or caMEK. Extracts (20 µg) were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes prior to Western blotting for HA-MEK1, p21<sup>Cip</sup> and p53. **Immunofluorescence analysis :** HIEC cells stably expressing wtMEK or caMEK were fixed with 3% paraformaldehyde and permeabilized with a solution of 0.1% Triton X-100 prior to immunofluorescence staining for p16<sup>INK4A</sup>. Bars: 10 µm. **B.** IEC-6 cell populations were harvested 2, 5, 10, 15, and 20 days after seeding. Cell extracts (60 µg) were separated by 10% SDS-PAGE and proteins analysed by Western blotting for cyclin D1, cdk4, cdk2, cyclin E, p27<sup>Kip1</sup> and actin expression.



**Figure 1**

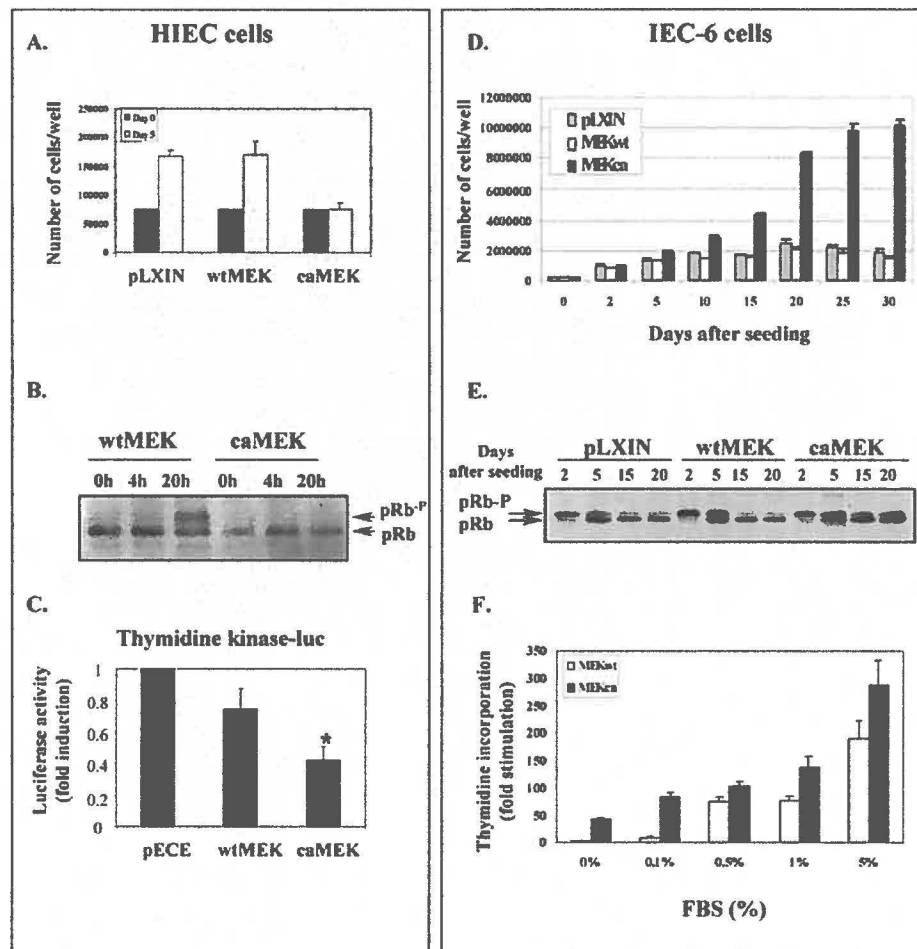
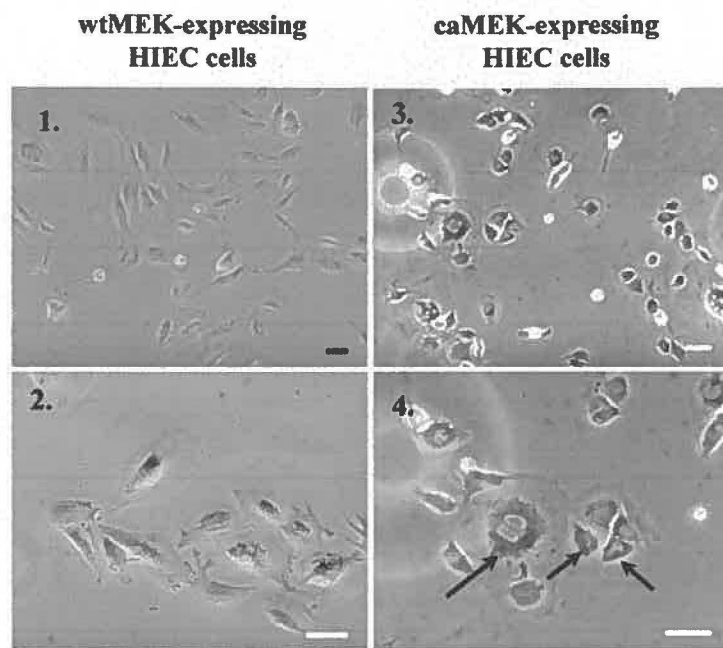
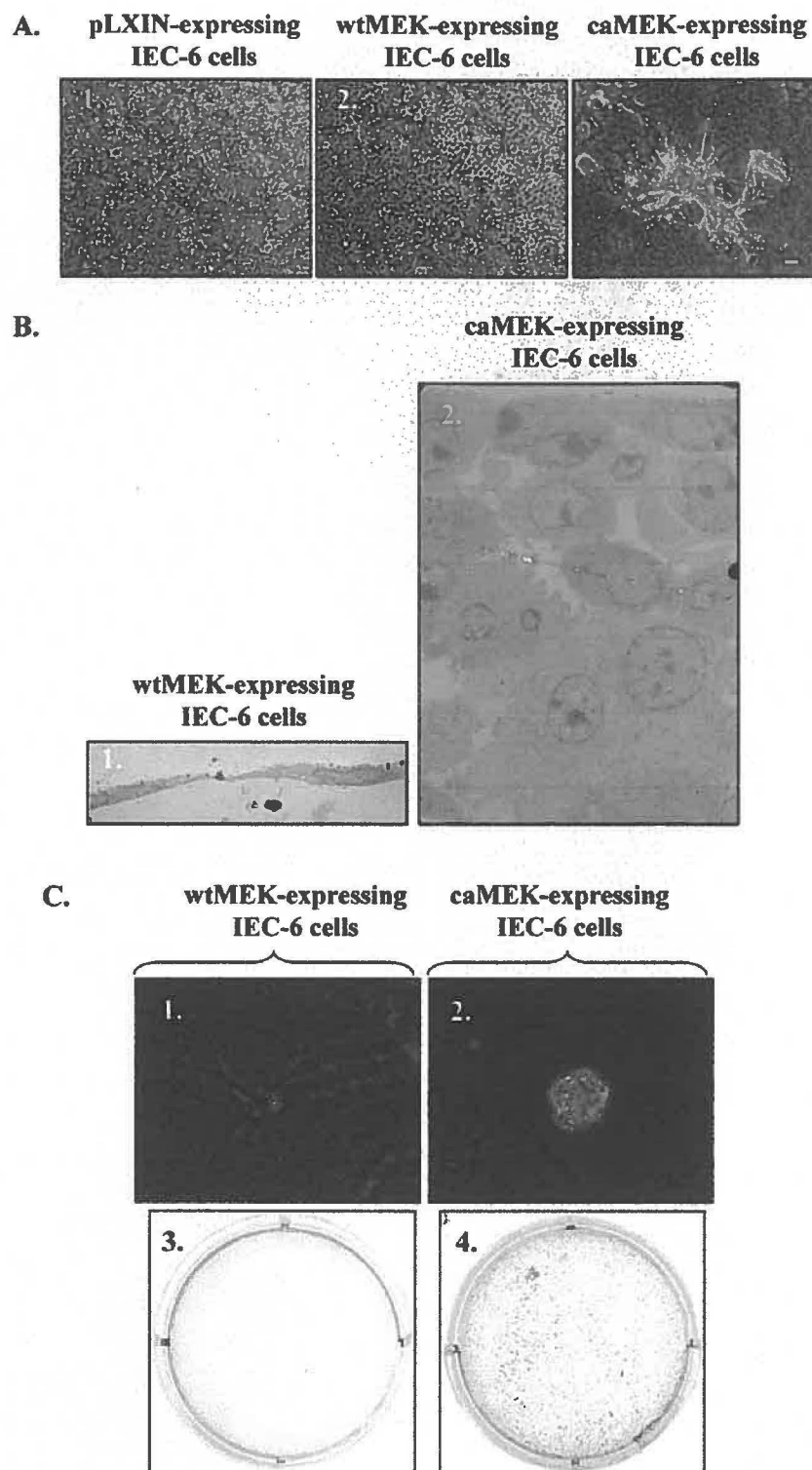


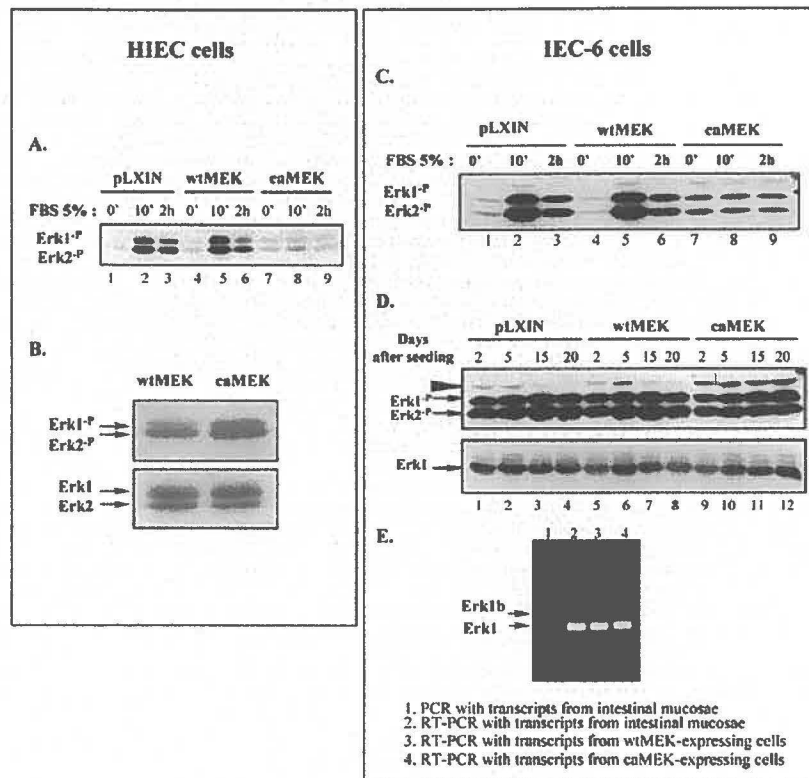
Figure 2



**Figure 3**

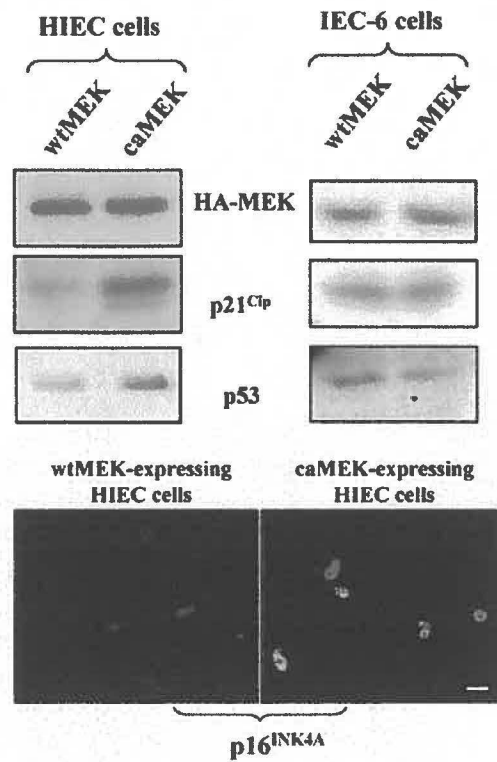


**Figure 4**



**Figure 5**

### A. Senescence-associated proteins



### B. G1-phase regulatory proteins

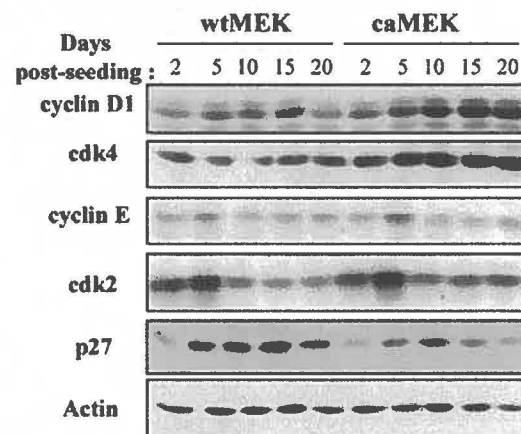
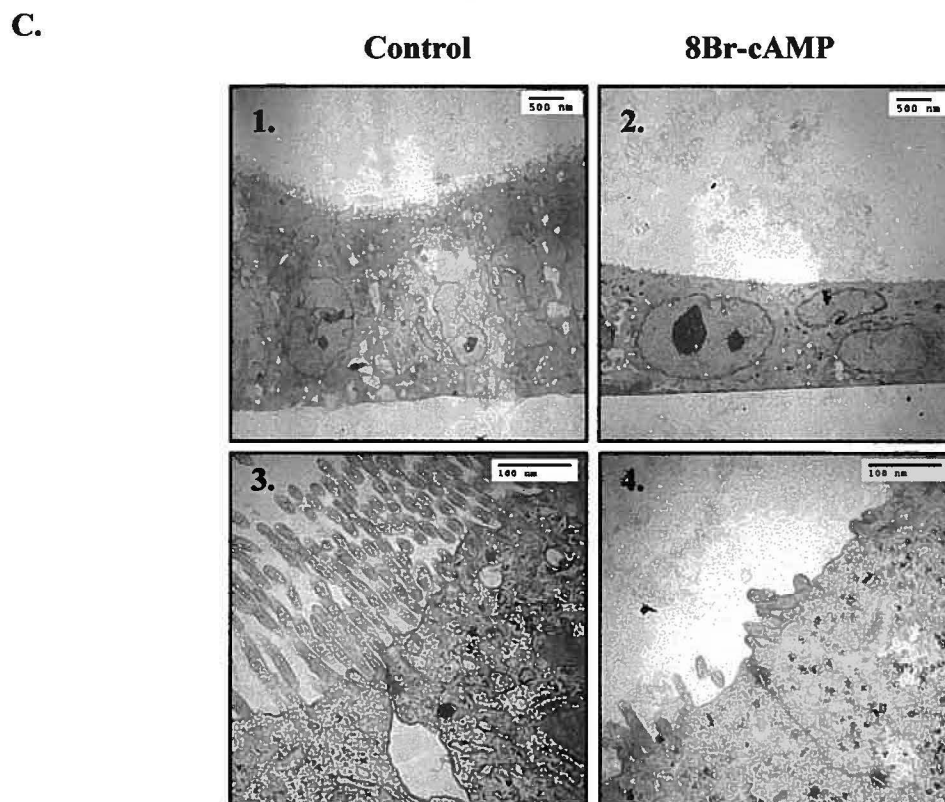
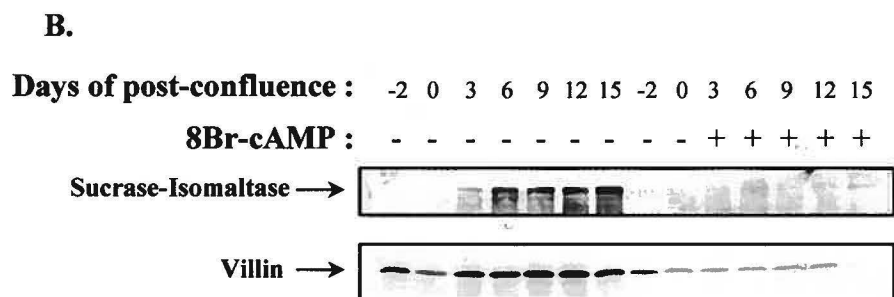
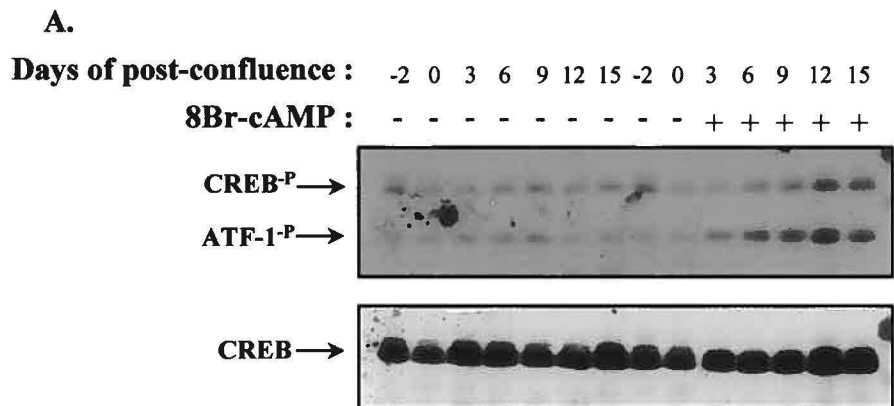
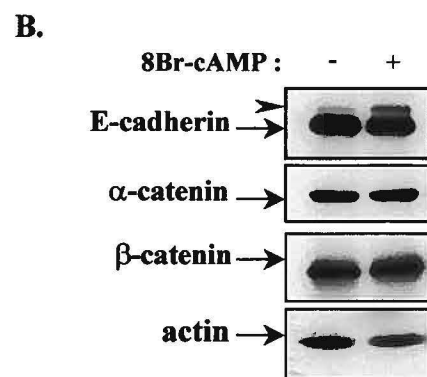
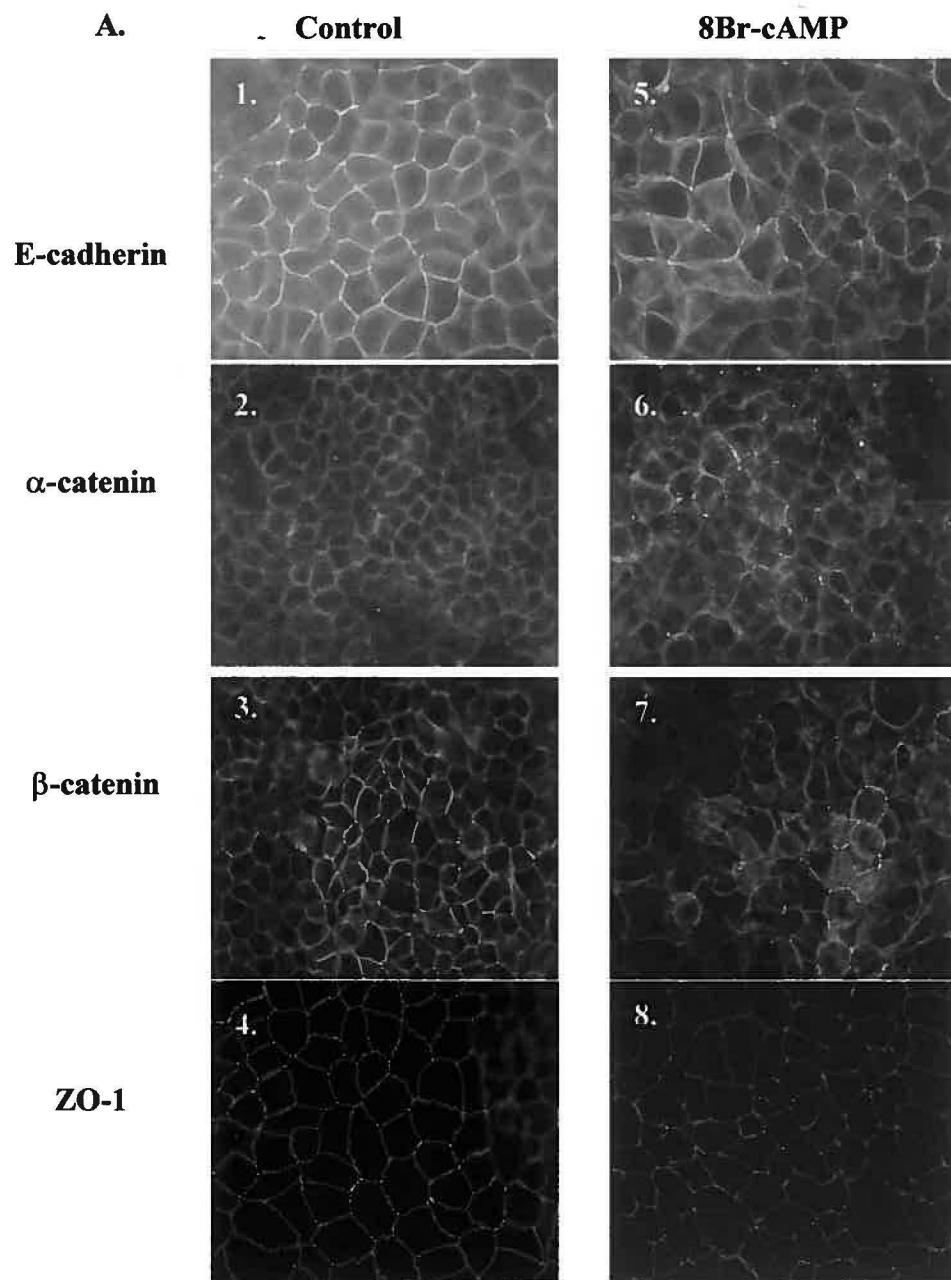


Figure 6

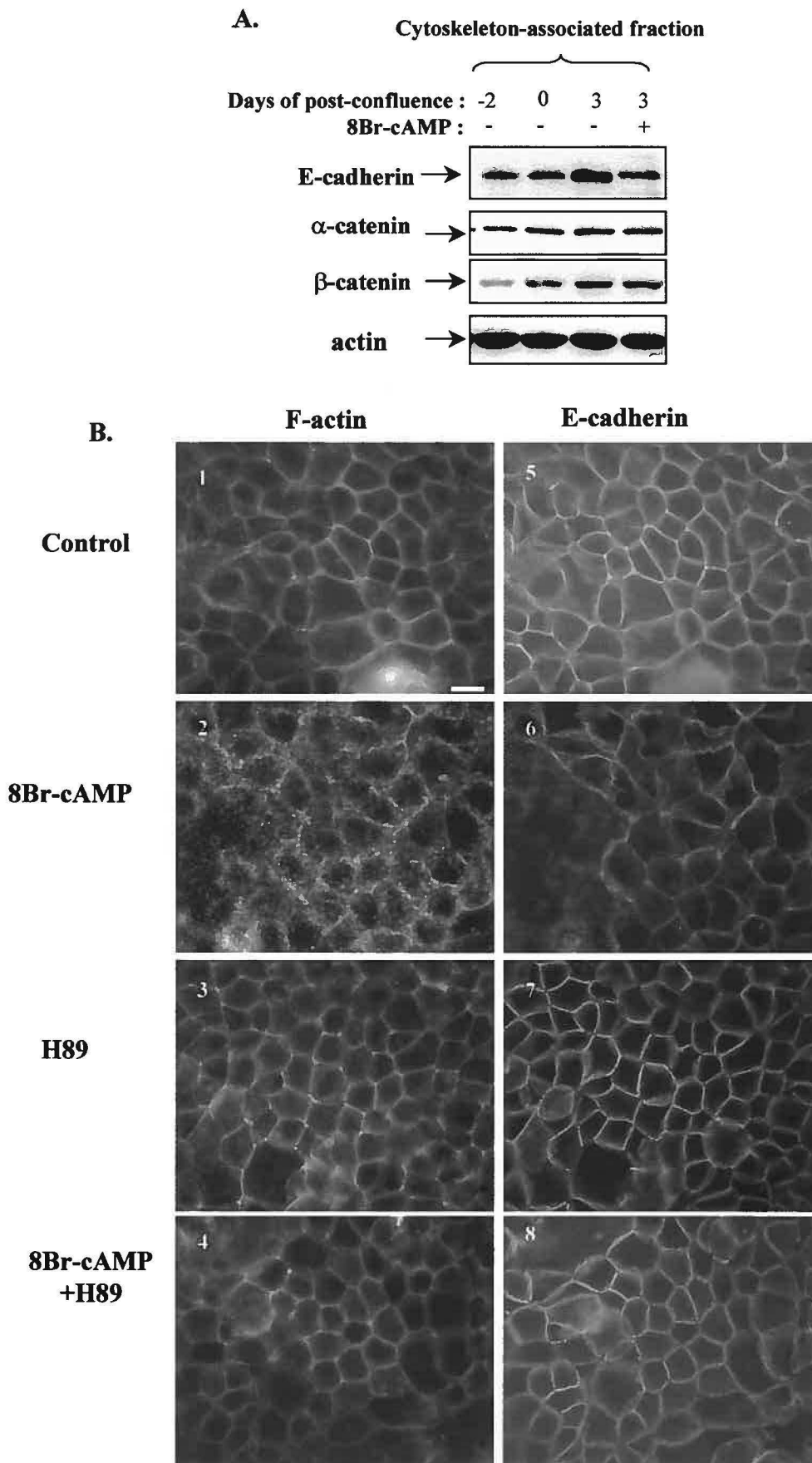




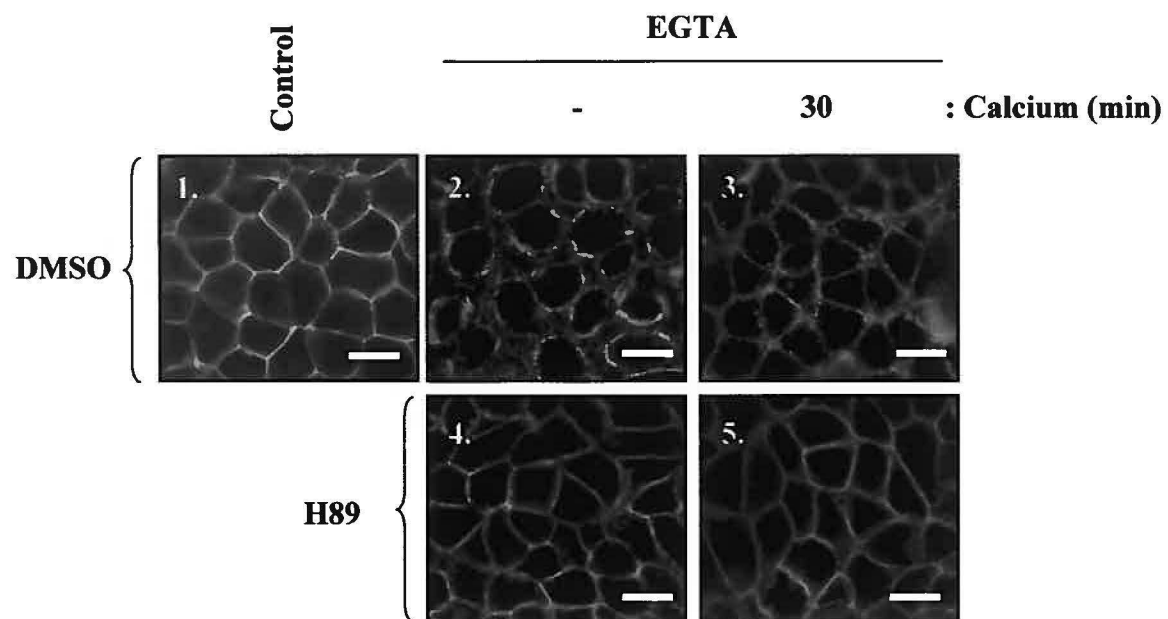
**Figure 1**



**Figure 2**

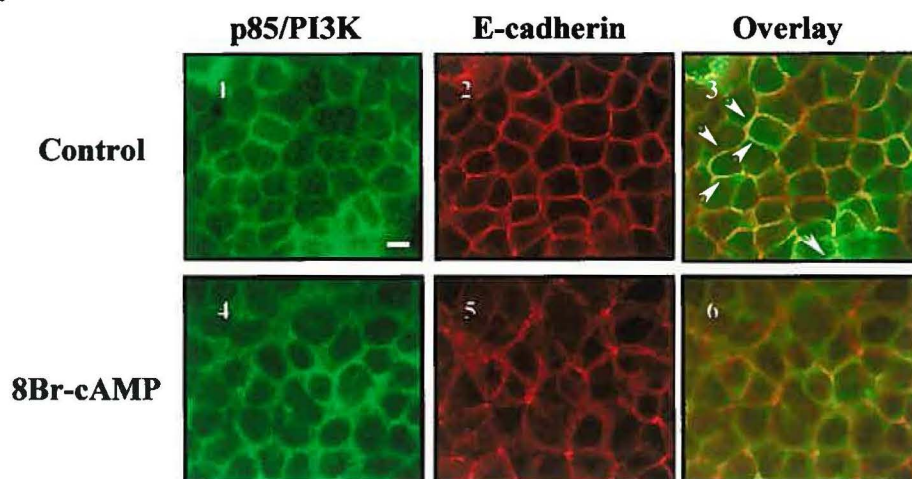


**Figure 3**

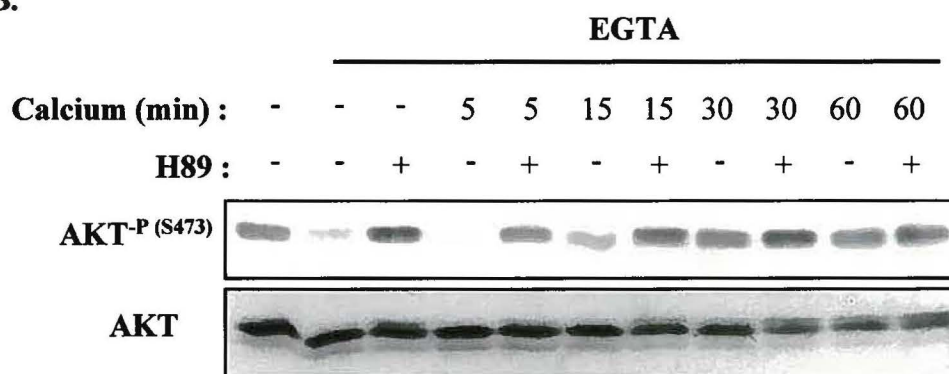


**Figure 4**

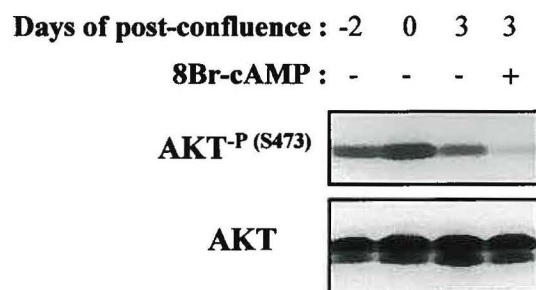
**A.**



**B.**

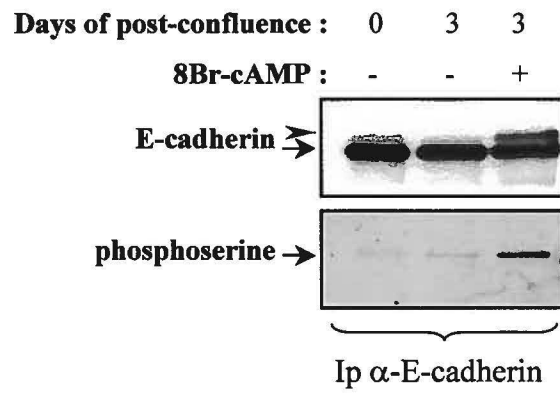


**C.**

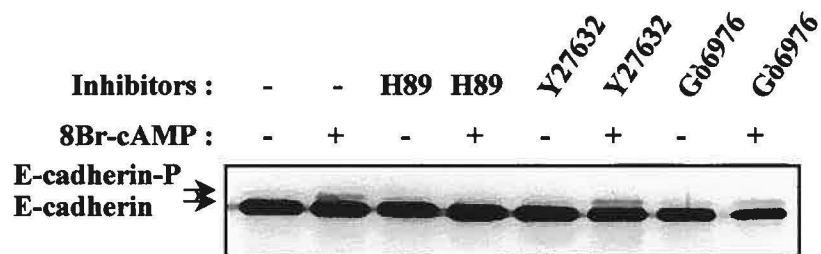


**Figure 5**

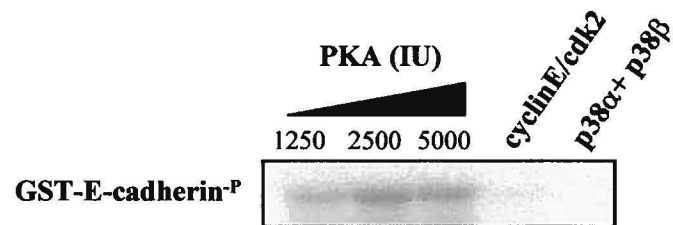
A.



B.



C.



D.

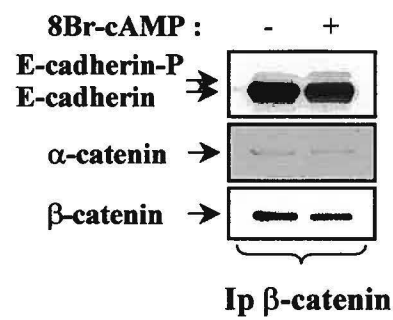
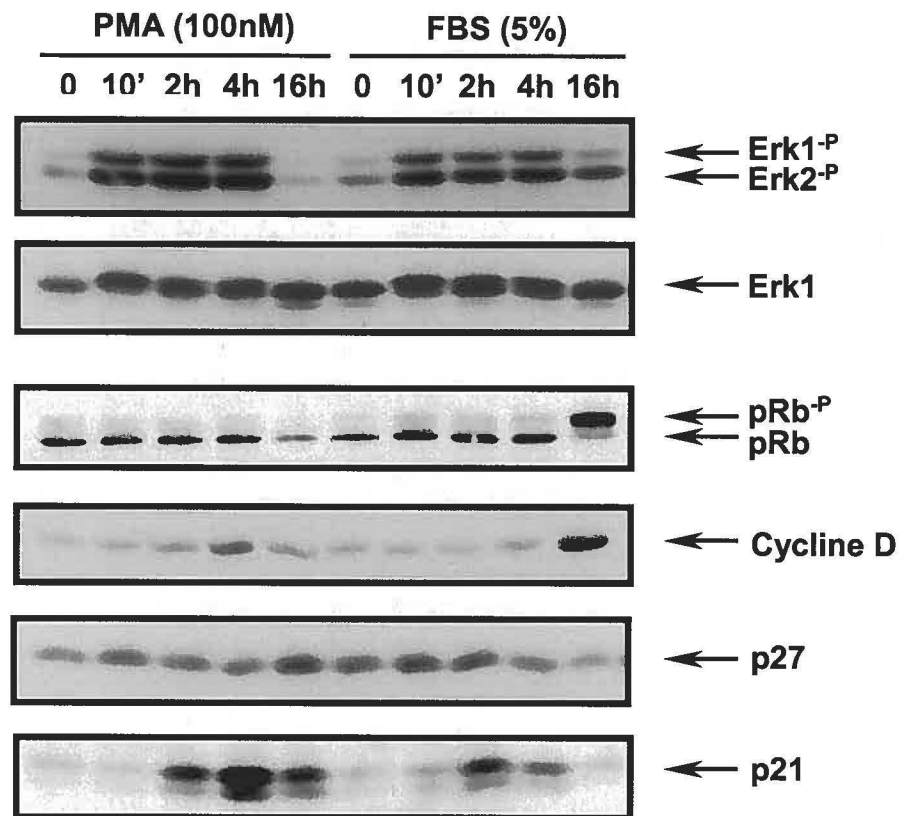


Figure 6

Ci-dessous sont joints des résultats supplémentaires qui viennent compléter le travail de l'article 1 et qui seront décrits plus en profondeur dans la section discussion. Ces résultats présentés dans le Complément 1 permettent de mieux expliquer le rôle de la cascade MEK/ERK dans la progression de la phase G1 du cycle cellulaire. Combinés aux résultats de l'article 1, ces résultats complémentaires permettront une meilleure compréhension du rôle de la cascade MEK/ERK dans la prolifération des cellules épithéliales intestinales.

## COMPLÉMENT 1

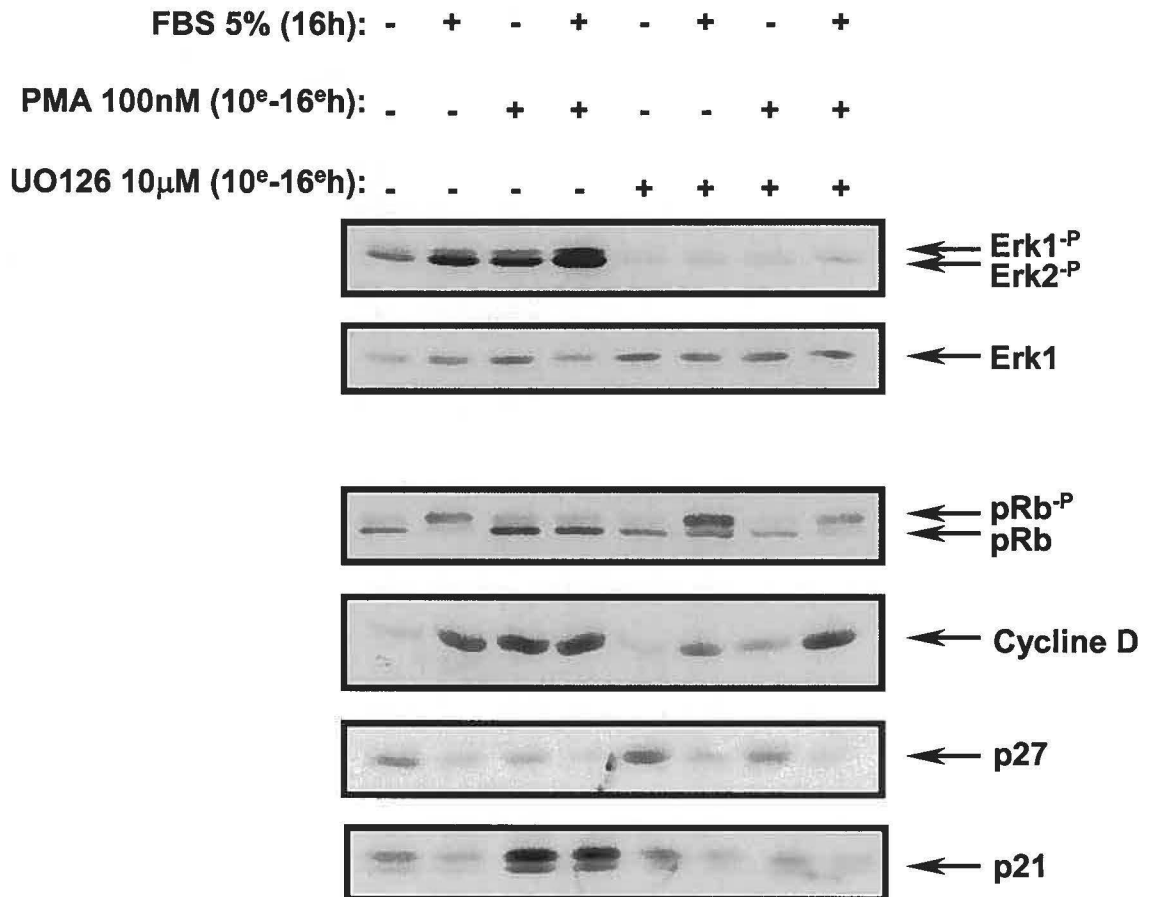


**FIGURE 1. Effets du PMA et du FBS sur l'activité des ERK1/2 et sur la progression de la phase G1 du cycle cellulaire**

Les cellules HIEC ont été privées en sérum pendant 36h avant d'être stimulées avec du PMA (100nM) ou du FBS 5% pour le temps indiqué. Les cellules ont par la suite été lysées avant d'effectuer les immunobuvardages avec les anticorps indiqués.



## COMPLÉMENT 1



**FIGURE 2. Contribution de l'inhibiteur p21 dans la non-atteinte du point de restriction suite à une activation soutenue de la cascade MEK/ERK**

Les cellules HIEC ont été privées en sérum pendant 36h avant d'être stimulées avec du FBS 5% pendant 16h. Après 10h de stimulation au FBS, du PMA (100nM)  $\pm$  UO126 (10 $\mu$ M) ont été ajoutés pendant les 6 dernières heures. Les cellules ont par la suite été lysées avant d'effectuer les immunobuvardages avec les anticorps indiqués.

## **2. REGULATION AND ROLE OF BRUSH BORDER-ASSOCIATED ERK1/2 IN INTESTINAL EPITHELIAL CELLS.**

Marie-Josée Boucher et Nathalie Rivard. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311** : 121-128.

Nous avons récemment montré qu'une forte activité des ERK stimule la prolifération des cellules épithéliales intestinales alors qu'une faible activité soutenue des ERK corrèle avec un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire et est requise pour l'expression protéique de certains marqueurs de différenciation entérocytaire. Dans le but de clarifier comment les ERK régularisent la différenciation entérocytaire, le présent travail évalue la distribution cellulaire et la régulation des ERK dans les cellules épithéliales intestinales différenciées. **RÉSULTATS.** Nous montrons que 1- les ERK1 et ERK2 et leurs modulateurs en amont Ras, p85/PI3K, Rac1, MEK, PKC $\alpha$  sont retrouvés dans la bordure en brosse des cellules épithéliales intestinales différenciées, 2- les ERK1/2 retrouvées dans la bordure en brosse sont activées par l'EGF et la prise de nourriture, 3- un substrat potentiel des ERK1/2 apicales pourrait être l'actine, et finalement, 4- l'inhibition de la cascade MEK/ERK par le UO126 altère l'architecture des microvillosités. **CONCLUSION.** Nos résultats suggèrent que les ERK1/2 pourraient jouer un rôle important dans le contrôle de l'architecture des microvillosités et possiblement, dans les réponses cellulaires associées à la bordure en brosse dans les cellules épithéliales intestinales différenciées.

**REGULATION AND ROLE OF BRUSH BORDER-ASSOCIATED ERK1/2 IN  
INTESTINAL EPITHELIAL CELLS**

***Marie-Josée Boucher and Nathalie Rivard \****

**CIHR Group on Functional Development and Physiopathology of the Digestive Tract,  
Département d'Anatomie et Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine,  
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada.**

***Running title: ERK signaling and intestinal epithelial cell differentiation***

**Key words :** ERK, brush border, junctions, intestinal epithelial cell differentiation.

**\* to whom correspondence should be sent:**

**Dr. Nathalie Rivard, Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire, Faculté de Médecine,  
Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, J1H5N4, Canada.**

**Phone: (819) 564-5271**

**Fax : (819) 564-5320**

**e-mail: Nathalie.Rivard@USherbrooke.ca**

## **ABSTRACT**

We have recently shown that elevated ERK activities stimulate proliferation of intestinal cells whereas low sustained levels of ERK activities correlate with G1 arrest and are required for expression of several enterocyte differentiation proteins. In an attempt to clarify how ERK1/2 regulates intestinal differentiation, the present study assessed the subcellular distribution and regulation of ERK proteins and activities in differentiated enterocytes. We report that 1) ERK1/2 and their upstream modulators Ras, p85 (PI-3K), Rac1 and MEK1 are found in the brush border; 2) brush border-associated ERK1/2 are stimulated by EGF and feeding; 3) immunoblotting of proteins phosphorylated on SP/K motif suggests the presence of ERK substrates in the brush border, one of which could be actin; 4) pharmacological inhibition of ERK alters microvilli architecture. Our results suggest that ERK may play important roles in the control of microvilli structure and possibly, in brush border-associated responses in differentiated intestinal epithelial cells.

## **INTRODUCTION**

Adult small intestinal enterocytes are highly polarized columnar cells with structural components adapted to the digestive function. These epithelial cells are endowed with a highly ordered apical brush border specifically designed for providing the enterocyte with maximal absorptive capacity for nutrient assimilation. Each of the 1000-2000 microvilli of a fully mature brush border is supported by a bundle of actin filaments, the basal end of which descends into the apical cytoplasm forming a rootlet approximately 1  $\mu$ M below the membrane. Here, a dense and complex meshwork of filaments in this so-called terminal web region interdigitates between the rootlets serving most likely to stabilize the overall brush border architecture while conferring a contractile capacity, modulating transepithelial resistance and nutrient transport [1,2].

Intestinal epithelial cells are continuously exposed to various stimuli such as bacteria and associated products (endotoxins), dietary components, luminal growth factors and inflammatory mediators (cytokines). Enterocytes react to these stimuli by rapidly adjusting the microvillus length, and thus their absorptive capacity, in response to changing needs incurred by gut activity during digestion and absorption of various dietary nutrients [3,4,5].

The response of intracellular signaling pathways within the intestine to septic insult has been studied extensively. Binding of endotoxin, growth factors or cytokines to membrane receptors activates a series of intracellular signaling cascades, including families of several PKC isozymes and MAP kinases such as extracellular signal-regulated kinase (ERK), Jun

amino-terminal kinase (JNK) and p38, ultimately resulting in various gene expression and biological responses [5]. These mechanisms are designed to allow the enterocyte to maintain intestinal homeostasis.

To achieve the specificity of each signaling pathway, cells often employ compartmentalization. Information as to the compartmentalization of specific signaling on microvilli of intestinal epithelial cells remains limited. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K) [4], cPLA2 [6] and myosin light chain kinase (MLCK) [2,7] have been reported to be localized at the apical surface or within the brush border of enterocytes. In the present study, we demonstrate that the ERK1/2 are localized in the brush border and may act locally to modulate microvilli architecture and brush border-associated function in human enterocytes.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Materials.** Monoclonal antibody HIS-14 against sucrase-isomaltase was kindly provided by Dr A. Quaroni (Cornell University, Ithaca, NY, USA). Antibody recognizing the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase pump was a kind gift from Dr D.M. Fambrough (Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA). Dr J. Pouyssegur (University of Nice, France) kindly provided the rabbit antibody that specifically recognizes MEK1. Antibodies raised against villin, E-cadherin, Rac1 and PKC $\alpha$  were purchased from Transduction Laboratories (Mississauga, Ontario, Canada). Antibody directed against the p85 regulatory subunit of PI-3K was obtained from Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY, USA). Anti-AKT and anti-phospho-ERK were purchased from Cell Signaling (Mississauga, ON, Canada) and anti-ERK1 (C16) from Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA). Antiserum OP40 specifically recognizing p21Ras was from Oncogene Sciences (Calbiochem, Mississauga, ON, Canada). The antibody specifically recognizing phosphoserine with a proline or lysine at their C-terminal was purchased from Biomol Cedarlane Laboratories (Hornby, ON, Canada). EGF was from Collaborative Biomedical (Bedford, MA, USA). TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  and IL6 were purchased from R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA). All other materials were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) unless stated otherwise.

**Animals.** Sprague-Dawley male rats (170-190g) were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada). Animals were fed Purina chow and water ad libitum until the start of the experiments and kept in a controlled temperature and light cycle environment (21°C; 12h light, 12h darkness). All studies were conducted in agreement with the principles and procedures

outlined in the Canadian Guidelines for Care and Use of Experimental Animals. 8 rats were fasted during 18 h. Thereafter, 4 fasted rats were sacrificed by decapitation. Of the remaining 4 fasting rats, 2 were re-fed for 1 h and two others re-fed for 3 h. The animals were then sacrificed and the jejunum removed for preparation of brush border membrane vesicles (BBMV), as described below.

**Human tissues and cell culture.** Tissues from human fetuses varying in age from 18-20 weeks of gestation (post-fertilization fetal ages estimated according to Streeter [8]) were obtained from normal elective pregnancy terminations. No tissue was collected from cases associated with a known fetal abnormality or fetal death. Studies were approved by the Institutional Human Subject Review Board (University of Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada). The human adenocarcinoma Caco-2/15 cell line was obtained from A. Quaroni (Cornell University, Ithaca, NY, USA) and was cultured as previously described [9,10]. These cells undergo morphological and functional differentiation to an enterocyte phenotype several days after they have reached confluency [9,10].

**Preparation of brush border membrane vesicles.** The mucosae of rat jejunum and human fetal jejunum were scraped and homogenized (H0) or differentiated Caco-2/15 cells (at least 25 days post-confluent) were lysed (H0) in Tris-HEPES 2 mM containing 50 mM mannitol, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin and 10 µg/ml aprotinin. BBMV were prepared by the calcium chloride precipitation method as previously described [11].  $\text{CaCl}_2$  was added to a final concentration of 10 mM for 10 min. Centrifugation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -treated homogenate at 5000g for 15 min yielded a P1 fraction which contains the total



recovered DNA and more than 90% of mitochondrial, microsomal and basolateral membranes. The P1 fraction was then resuspended in Laemmli's buffer (62.5mM Tris-HCl pH6.8, 2.3% SDS, 10% glycerol, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.005% bromophenol blue, 1 mM PMSF). The first supernatant (S1) was centrifuged at 30000g for 30 min. The second supernatant (S2) which contains lysosomes and some microsomal membranes and the second pellet (P2) which contains BBMV were then lysed in Laemmli's buffer.

**Western blotting.** Western blot analyses were performed essentially as described previously [9].

**Immunofluorescence.** Fully differentiated Caco-2/15 cells (30 days post-confluence) were embedded in optimum cutting temperature compound, and quickly frozen in liquid nitrogen. Frozen sections of 3  $\mu$ m were spread onto silane-coated glass slides and air dried. Samples were immunostained for 1 h with primary antibody and 30 min with secondary antibody. Negative controls (no primary antibody) were included in all experiments.

**Electron Microscopy.** Electron microscopy was performed as described previously [10]. All reagents were purchased from Electron Microscopy Sciences (Cedarlane, Hornby, ON, Canada).

**Isolation of Cytoskeleton-Associated Proteins.** Cells were first washed twice with ice-cold PBS and then soluble proteins extracted on ice with cold lysis/cytoskeleton stabilization buffer (0.5% Triton-X100, 50 mM NaCl, 10 mM PIPES, pH 6.8, 300 mM sucrose, 3 mM  $MgCl_2$ ). Cytoskeleton-associated proteins (insoluble fraction) were harvested by centrifugation (13000 rpm at 4°C for 10 min) and solubilized in Laemmli buffer. Finally, ERK and E-cadherin levels were determined by immunoblot of the cytoskeleton and soluble fractions.

## **RESULTS**

### **Subcellular distribution of ERK1/2 and other signaling proteins in differentiated enterocytes.**

In an attempt to analyze the subcellular distribution of ERK proteins in differentiated enterocytes, homogenates from intestinal fetal mucosae and from 25-day post-confluent Caco-2/15 cells were fractionated and brush border vesicles were prepared by  $\text{Ca}^{2+}$  precipitation, as described previously [11]. As expected, the brush border-enriched fraction (P2) was found to be enriched in villin and sucrase-isomaltase while the P1 fraction contained the bulk of the basolateral membranes as visualized by protein expression of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pump (Fig. 1A). E-cadherin was distributed throughout the P1 and P2 fractions, consistent with previous observation that E-cadherin is expressed along the lateral membrane of intestinal epithelial cells [10]. As shown in Fig. 1B, expression of ERK1 and ERK2 was detected in all fractions including the brush border-enriched P2 fraction. Using a polyclonal antibody specific for the detection of phosphorylated ERK1 and ERK2, ERK activity was mostly detected in the P1 and P2 fractions derived from the human fetal intestinal mucosae but uniformly detected in all fractions derived from differentiated Caco-2/15 cells. On longitudinal sections, immunostaining of differentiated Caco-2/15 cells (30 days post-confluency) confirmed that ERK1/2 were distributed uniformly. Interestingly, a sharp staining of the apical surface of the epithelial cells was also observed (Fig. 1C, see arrowheads). As expected, sucrase-isomaltase, an enterocyte differentiation marker, was detected at the apex of the cells (Fig. 1C, see arrowheads).

The compartmentalization of ERK activity in several fractions and particularly in the brush border fraction prompted us to investigate whether known upstream regulators of ERK cascade were also expressed in these fractions in both human fetal intestine and differentiated

Caco-2/15 cells. The expression of Ras, MEK1, the p85 regulatory subunit of PI-3K, Akt, Rac1 and PKC $\alpha$ , all known to potently influence the ERK signaling cascade in different cell types, was therefore analyzed [12]. As shown in Fig. 1D, the small G proteins Ras and Rac as well as p85 (PI-3K) and PKC $\alpha$  were mostly detected in the P1 and P2 fractions from both fetal intestine and differentiated Caco-2/15 cells. The dual specificity kinase MEK1 and the kinase Akt were also detected in the P1 and P2 fractions but were predominantly found in the supernatant fractions.

#### **Effect of EGF, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ and feeding on ERK1/2 activity in enterocytes.**

In an attempt to characterize the regulation of ERK1/2 in differentiated intestinal epithelial cells, enzymatic activation of ERK1/2 by various agonists was assessed. Cell fractions were prepared from 3 week-post-confluent cells initially stimulated for 15 min with EGF (50 ng/ml) and for 20 min with TNF- $\alpha$  (30 pg/ml), IL-6 (10 pg/ml) or IL-1 $\beta$  (10 ng/ml). As shown in Fig. 2A, control differentiated Caco-2/15 cells exhibited minimal ERK activities in all recovered fractions. Addition of EGF dramatically increased ERK activities in all fractions, including the brush border-enriched fraction (P2). By contrast, treatment with TNF- $\alpha$ , IL-6 or IL-1 $\beta$  enhanced ERK1/2 phosphorylation levels, moderately in S1 and S2 fractions and slightly in P1 and P2 fractions. These modulations occurred without any variation in total amount or subcellular distribution of ERK-1/2 (Fig. 2B). There was no significant induction of ERK activities detected in any of the fractions following 20 min of LPS or butyrate treatment (data not shown).

As the primary function of the intestinal epithelium is the terminal digestion and absorption of water and nutrients, ERK1/2 activities were analyzed in rat gut epithelium under conditions of fasting and of re-feeding. Rats were fasted overnight and re-fed for 1 or 3h. One hour after feeding, pancreatic enzymes and biliary acid have now reached the duodenum,

initiating the process of terminally digesting the chyme emanating from the stomach. After 3h of feeding, digestive and absorptive processes are fully initiated [13]. In rat intestinal mucosae, total and phosphorylated ERK1/2 were mostly detected in P1 and P2 fractions (Fig. 2C). Re-feeding of fasted rats markedly enhanced ERK phosphorylation levels, especially after 3h when terminal digestion and absorption were well initiated [13]. These modulations occurred without any variation in total amount or subcellular distribution of ERK-1/2 (Fig. 2C). Of note is that the highest ERK1/2 activation levels were observed in BBMV fractions (P2) suggesting that, in a physiological context of normal differentiated enterocytes, ERK1/2 proteins may regulate brush border-associated functions.

#### **Evidences of ERK1/2 substrates in brush border of enterocytes.**

In a first attempt to identify brush border-associated ERK substrates, differentiated Caco-2/15 cells were treated with UO126, followed by preparation of brush border-enriched fractions, and by an immunoblot with an antibody which specifically recognizes proteins phosphorylated on a serine localized immediately ahead of either a proline or lysine. ERK1/2 are proline-directed serine/threonine kinases recognizing the consensus sequence PX(T/S)P [12]. As shown in Fig. 3A, treatment of differentiated Caco-2/15 cells with UO126 drastically inhibited ERK1/2 activities in all fractions studied. Immunoblotting with phosphoserine antibodies revealed that one S1-associated protein (lane 4) and several P2-associated proteins (lane 10) were less phosphorylated following UO126 treatment. UO126 reduced phosphorylation of P2-associated proteins with approximate molecular masses of 31, 36, 46 and 48 kDa (Fig. 3A, lane 10, see arrows). When immunoblots were performed using the anti-actin antibodies, actin aligned precisely with p46 (Fig. 3B). Therefore, these data reveal the presence of ERK substrates in the brush border of enterocytes, one of which could be actin.

The major components of the intestinal brush border involve actin cytoskeleton-associated proteins and hence cannot be extracted with a 0.5% solution of the non-ionic detergent Triton X-100, but are found in the insoluble fraction. Experiments were therefore conducted to analyze whether ERK1/2 are associated with the cytoskeleton in differentiating intestinal epithelial cells. As shown in Fig. 3C, differentiation of Caco-2/15 cells resulted in a significant increase in the proportion of E-cadherin associated with the cytoskeleton, correlating with the assembly of adherens junction components with cortical F-actin [10]. Of special interest was the progressive increased association of ERK1 and ERK2 with the cytoskeleton during differentiation of Caco-2/15 cells, suggesting that ERK may regulate locally cytoskeletal-associated processes in enterocytes.

#### **Role of ERK1/2 in differentiated intestinal epithelial cells.**

To investigate the role of ERK in intestinal epithelial cell differentiation, the impact of its inhibition was evaluated on morphological differentiation of Caco-2/15 cells. Cell cultures were characterized by transmission electron microscopy 4 days after confluence. As shown in Fig. 4, at 4 days post-confluency, Caco-2/15 cells began to exhibit certain ultrastructural characteristics similar to that found in the intact villus epithelium, including presence of microvilli (panel 2, see arrowheads) as well as junctional complexes (panel 2, see arrows). Addition of the pharmacological inhibitor of MEK1/2, UO126, at day 0 to 4 post-confluence did not alter cell polarization or the assembly and maturation of junctional complexes (panels 3 and 4, see arrows). This is consistent with the fact that inhibition of ERK in these cells did not influence transepithelial resistance (data not shown). However, several microvilli had an irregular, slightly swollen shape (Fig. 4, panel 4, see arrowheads) while others were fragmented, suggesting that ERK may be implicated in the control of microvilli architecture.

## **DISCUSSION**

We have recently shown that elevated ERK activities stimulate proliferation of intestinal cells whereas low sustained levels of ERK activities correlate with G1 arrest and enterocyte differentiation. Addition of the MEK1 inhibitor, PD98059, during differentiation interfered with sustained activation of ERK and sucrase-isomaltase expression, suggesting a role of ERK signaling in differentiated intestinal epithelial cells [9]. In a first attempt to clarify how ERK1/2 regulate intestinal epithelial cell differentiation, the present study assessed the subcellular distribution of ERK proteins and activities in differentiated enterocytes. The prominent localization of ERK1/2 and their upstream modulators Ras, p85 (PI-3K), Rac1 and MEK1 in the brush border of human enterocytes suggests that one of the sites of action of ERK signaling is at the apex of these cells. This is consistent with the observation that inhibition of ERK alters microvillus structure and that stimulation of ERK activity by feeding occurs predominantly at the brush border of rat intestinal epithelial cells. Therefore, we propose that ERK may contribute to the regulation of some brush border-associated functions.

The cellular localization of ERK in the brush border-associated enriched fraction of Caco-2 cells and intestinal epithelium places it at location where it can actively participate in apical signal transduction. In this regard, it is of interest that some of the known substrates of ERK1/2 have locations similar to that observed herewith for ERK proteins in human enterocytes. Among the potential substrates, cPLA<sub>2</sub> has been localized at the apical surface of the plasma membrane and can be phosphorylated and activated by ERK1/2 [6]. The MLCK present in the intestinal brush border [2,7] has been shown to be phosphorylated and activated by ERK1/2 in FG carcinoma cells [14]. In addition, caldesmon and cortactin, two actin-binding proteins

previously described as localized in the terminal web of enterocytes [15,16] are similarly phosphorylated by ERK1/2 [17,18]. This apical localization of ERK has also been reported in chicken [19] and human [9] intestinal epithelium. In addition, it has been recently reported that Ras, Raf, MEK and ERK1/2 were all associated with microvillar microfilaments of ascite cells isolated from rat mammary adenocarcinoma [20]. Therefore, the presence of ERK1/2 at a site involved in regulating microfilament and cell surface dynamics suggests that these enzymes may play important roles in brush border-associated responses or in the control of microvilli architecture.

The brush border of intestinal epithelial cells, an evolutionary adaptation designed to increase the surface area for digestion and absorption of ions and nutrients, appears to be a primary site of action of EGF and gastrointestinal hormones in the small intestine [1,2]. For instance, EGF and diet have been shown to regulate transport function in differentiated intestinal cells [21, 22]. This effect is associated with increases in both brush border surface area and total absorptive surface area, primarily due to an increase in microvillus height [22, 23]. Of particular interest is the fact that ERK inhibition in enterocytes alters microvilli architecture. Indeed, we observed that many microvilli appeared somewhat swollen and even fragmented following treatment of cells with the MEK inhibitor. Such microvillus phenotype has been recently demonstrated in duodenal and jejunal villus epithelial cells in fasted rats [24]. Interestingly, we found that feeding markedly enhanced brush border-associated ERK activities. Taken together these findings indicate that ERK1/2 may exert some biological effects via alterations in microvilli shape. This is consistent with our results demonstrating the localization of ERK1/2 proteins in the microfilament-rich apical region of enterocytes and their association with the cytoskeleton during differentiation. However, the mechanism by which ERK1/2 may alter microvilli structure remains to be determined. Our data do suggest however that brush-border associated proteins like actin could be phosphorylated on serine residues by ERK1/2 or in a ERK1/2-dependent manner. Such serine phosphorylation of actin has been reported following EGF stimulation in A431 and

HER14 cells [25]. It has been suggested that a possible function of actin phosphorylation is to create a specific binding site for other proteins. Furthermore, there is evidence that actin phosphorylation facilitates actin polymerization [26]. In addition an association of ERK with contractile filaments of actin has been previously reported in vascular smooth cells stimulated with phenylephrine [27]. As such, it is plausible that the ERK-induced phosphorylation of actin is involved in increased actin polymerization observed in microvilli in response to EGF [3,23] or feeding [22,28]. It should be mention that caldesmon is another potential cytoskeletal target for brush border-associated ERK1/2. Indeed, caldesmon is a major actin-, myosin-, tropomyosin- and calmodulin-binding protein which exhibits inhibitory function toward actin-tropomyosin-activated myosin ATPase activity. Phosphorylation of caldesmon by ERK1/2 has been shown to attenuate its interaction with actin [17] and to release actomyosin interaction [29].

In summary, our findings demonstrate that the ERK signaling pathway is present in the brush border of human intestinal epithelial cells. Moreover, ERK1/2 present in the brush border are stimulated by EGF and feeding, suggesting a role in nutrient, ion transport or other brush border-associated functions. Our findings indicate that ERK1/2 may exert some biological effects via alterations in microvilli shape of enterocytes. However, a potential activation of these enzymes cannot be excluded following epithelial cell injury since ERK1/2 were significantly activated after mechanical wounding of IEC-6 cells [30]. Current investigations are presently underway to further clarify the physiological role of brush border-associated ERK1/2 in differentiated intestinal epithelial cells.



## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Pierre Pothier for the critical reading of the manuscript. This research was supported by grant from Canadian Institutes of Health Research (MT-14405 to NR). N.R. is a recipient of a Canadian Research Chair in Signaling and Digestive Physiopathology. M.J.B. is a student scholar from the Fonds pour la Recherche en Santé du Québec.

## REFERENCES

- [1] R. Holmes, R.W. Lobley, Intestinal brush border revisited, *Gut* 30(1989) 1667-1678.
- [2] D. Louvard, M. Kedinger, H.P. Hauri, The differentiating intestinal epithelial cell: establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures, *Annu. Rev. Cell Biol.* 8(1992) 157-195.
- [3] B.M. Chung, J.K. Wong, J.A. Hardin, D.G. Gall, Role of actin in EGF-induced alterations in enterocyte SGLT1 expression, *Am. J. Physiol.* 276(1999) G463-G469.
- [4] S. Khurana, S.K. Nath, S.A. Levine, J.M. Bowser, C.M. Tse, M.E. Cohen, M. Donowitz, Brush border phosphatidylinositol 3-kinase mediates epidermal growth factor stimulation of intestinal NaCl absorption and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange, *J Biol Chem.* 271(1996) 9919-9927.
- [5] G. Hecht, Microbes and Microbial Toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. VII. Enteropathogenic *Escherichia Coli*: physiological alterations from an extracellular position, *Am. J. Physiol.* 281(2001) G1-G7.
- [6] L. Lin, M. Wartmann, A. Lin, J.L. Knopf, A. Seth, R.J. Davis, cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase, *Cell* 72(1993) 269-278.
- [7] J.P. Rieker, J.H. Collins, Phosphorylation of brush border myosin by brush border calmodulin-dependent myosin heavy and light chain kinases, *FEBS Letters* 223(1987) 262-266.

- [8] G.L. Streeter, Weight, sitting head, head size, foot length and menstrual age of human embryo, *Contr. Embryol.* 11(1920) 143-179.
- [9] J.C. Aliaga, C. Deschênes, J.-F. Beaulieu, E.L. Calvo, N. Rivard, Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells, *Am. J. Physiol.* 277(1999) G631-G641.
- [10] P. Laprise, P. Chailier, M. Houde, J.-F. Beaulieu, M.-J. Boucher, N. Rivard, Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation, *J. Biol. Chem.* 277(2002) 8226-8234.
- [11] J. Schmitz, H. Preiser, D. Maestracci, B.K. Ghosh, J.J. Cerda, R.K. Crane, Purification of the human intestinal brush border membrane, *Biochim. Biophys. Acta* 323(1973) 98-112.
- [12] H.J. Schaeffer, M.J. Weber, Mitogen-Activated Protein Kinases: specific messages from ubiquitous messengers, *Mol. Cell. Biol.* 19(1999) 2435-2444.
- [13] V.L.W. Go, J.D. Gardner, F.P. Brooks, E. Lebenthal, E.P. DiMagno, G.A. Scheele, *The exocrine pancreas: biology, pathobiology and diseases*, Raven Press, New York, 1986.
- [14] R.L. Klemke, S. Cai, A.L. Giannini, P.J. Gallagher, P. de Lanerolle, D.A. Cheresh, Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase, *J. Cell Biol.* 137(1997) 481-492.

- [15] H. Wu, K.T. Montone, Cortactin localization in actin-containing adult and fetal tissues, *J. Histochem. Cytochem.* 46(1998) 1189-1191.
- [16] C. Rochette-Egly, K. Haffen, Developmental pattern of calmodulin-binding proteins in rat jejunal epithelial cells, *Differentiation* 35(1987) 219-227.
- [17] T. Childs, M.H. Watson, J.S. Sanghera, D.L. Campbell, S.L. Pelech, A.S. Mak, Phosphorylation of smooth muscle caldesmon by mitogen-activated protein (MAP) kinase and expression of MAP kinase in differentiated smooth muscle cells, *J. Biol. Chem.* 267(1992) 22853-22859.
- [18] D.H. Campbell, R.L. Sutherland, R.J. Daly, Signaling pathways and structural domains required for phosphorylation of EMS1/Cortactin, *Cancer Res.* 59(1999) 5376-5385.
- [19] S.N. Mamajiwalla, D.R. Burgess, Differential regulation of the activity of the 42 kDa mitogen activated protein kinase (p42 MAPK) during enterocyte differentiation *in vivo*, *Oncogene* 11(1995) 377-386.
- [20] C.A.C. Carraway, M.E. Carvajal, K.L. Carraway, Association of the Ras to mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway with microfilaments, *J. Biol. Chem.* 274(1999) 25659-25667.

- [21] K. Opleta-Madsen, J. Hardin, D.G. Gall, Epidermal growth factor upregulates intestinal electrolyte and nutrient transport, *Am. J. Physiol.* 260(1991) G807-G814.
- [22] I.S. King, J.Y. Paterson, M.A. Peacock, M.W. Smith, G. Syme, Effect of diet upon enterocyte differentiation in the rat jejunum, *J. Physiol.* 344(1983) 465-481.
- [23] J.A. Hardin, A. Buret, J.B. Meddings, D.G. Gall, Effect of epidermal growth factor on enterocyte brush border surface area, *Am. J. Physiol.* 264(1993) 312-318.
- [24] M.J. Martins, C. Hipolito-Reis, I. Azevedo, Effect of fasting on rat duodenal and jejunal microvilli, *Clin. Nutr.* 20(2001) 325-331.
- [25] S. Van Delft, A.J. Verkleij, J. Buonstra, P.M.P. van Bergen en Henegouwen, Epidermal growth factor induces serine phosphorylation of actin, *FEBS Letters* 357(1995) 251-254.
- [26] Y. Ohta, T. Akiyama, E. Nishida, H. Sakai, Protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase induce opposite effects on actin polymerizability, *FEBS Letters* 222(1987) 305-310.
- [27] R.A. Khalil, C.B. Menice, C.-L. Albert Wang, K.G. Morgan, Phosphotyrosine-dependent targeting of mitogen-activated protein kinase in differentiated contractile vascular cells, *Circ. Res.* 76(1995) 1101-1108.
- [28] K. Yamauchi, H. Kamisoyama, Y. Isshiki, Effects of fasting and refeeding on structures of the intestinal villi and epithelial cells in white Loghorn hens, *Br. Poult. Sci.* 37(1996) 909-921.

[29] C. Dessy, I. Kim, C.L. Sougnez, R. Laporte, K.G. Morgan, A role for MAP kinase in differentiated smooth muscle contraction evoked by alpha-adrenoreceptor stimulation, *Am. J. Physiol.* 275(1998) C1081-C1086.

[30] M. Göke, M. Kanai, K. Lynch-Devaney, D.K. Podolsky, Rapid mitogen-activated protein kinase activation by transforming growth factor  $\alpha$  in wounded rat intestinal epithelial cells, *Gastroenterology* 114(1998) 697-705.

## **FIGURE LEGENDS**

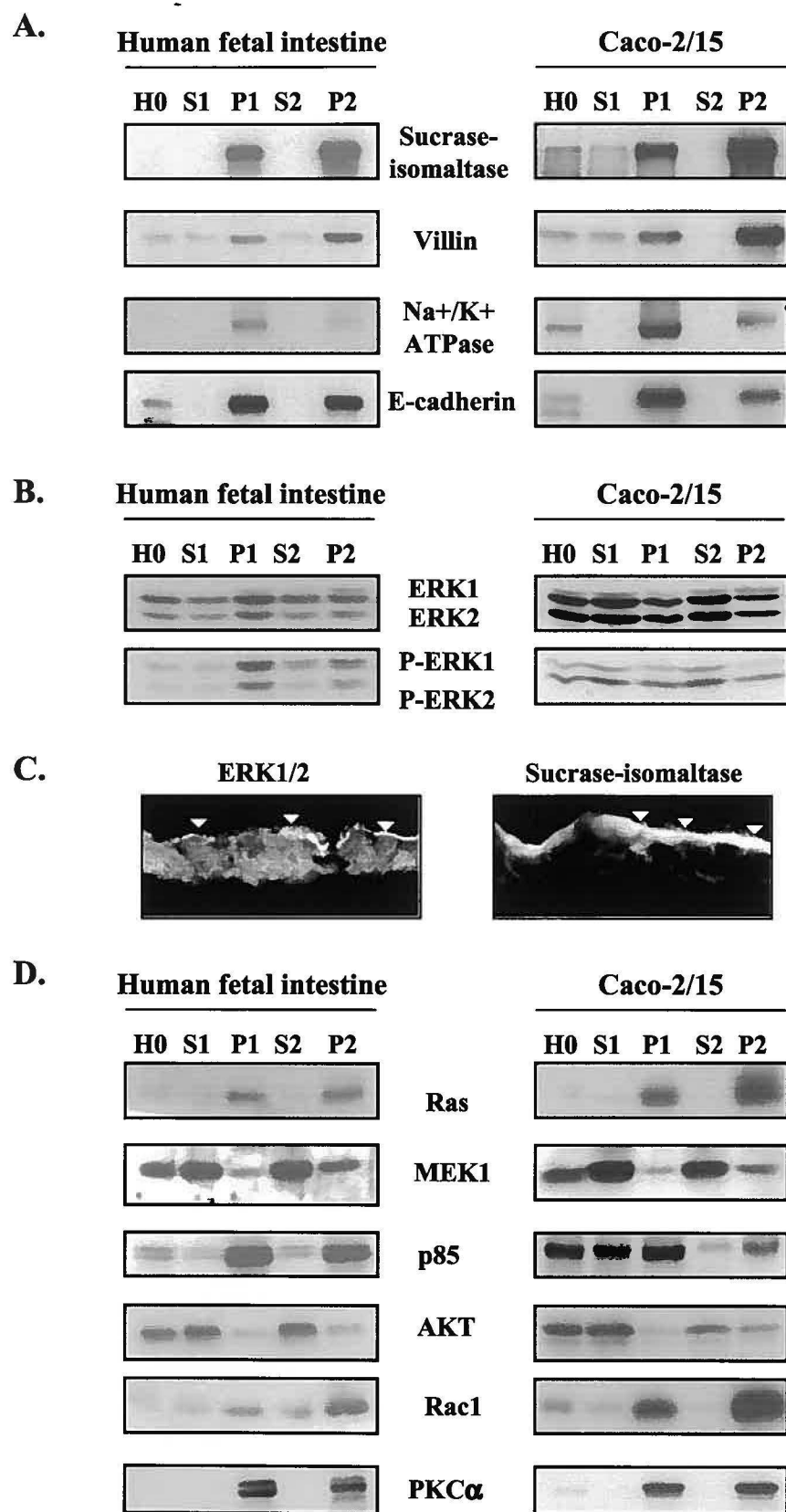
**Figure 1. Subcellular distribution of ERK1/2 and other signaling proteins in differentiated enterocytes.** BBMVs were prepared from mucosae of human fetal intestine or 25-day post-confluent Caco-2/15 cells, as described in Material and Methods. Equal amounts of proteins from each fraction were separated by SDS-PAGE and protein expression analyzed by Western blotting using antibodies against sucrase-isomaltase, villin, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase and E-cadherin (**A**) or ERK1/2 and phosphorylated ERK1/2 (**B**) or Ras, MEK1, p85/PI-3K, AKT, Rac1 and PKC $\alpha$  (**D**). H0 : homogenate; S1 : Supernatant 1; P1 : Pellet 1; S2 : Supernatant 2; P2: Pellet 2 containing BBMVs. P-ERK : phosphorylated and activated ERK. **C.** Fully differentiated Caco-2/15 cells were embedded in OCT freezing medium and sectioned longitudinally, fixed and labeled for ERK1/2 and sucrase-isomaltase proteins.

**Figure 2. Effect of EGF, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and feeding on ERK1/2 activity in enterocytes.**  
**A.** 20-day post-confluent Caco-2/15 cells seeded on a Transwell polycarbonate filter were stimulated basolaterally with EGF (50 ng/ml) for 15 min. **B.** 25-day post-confluent Caco-2/15 cells were untreated (control) or treated for 20 min with TNF- $\alpha$  (30 pg/ml), IL-6 (10 pg/ml) or IL-1 $\beta$  (10 ng/ml). **C.** Rats were sacrificed by decapitation after 18 h of starvation or after 1 h and 3 h of re-feeding. **A, B and C.** BBMVs were prepared and equal amounts of proteins from each fraction were separated by SDS-PAGE and protein expression was analyzed by Western blotting using antibodies against ERK1/2 and phosphorylated ERK1/2 (P-ERK).

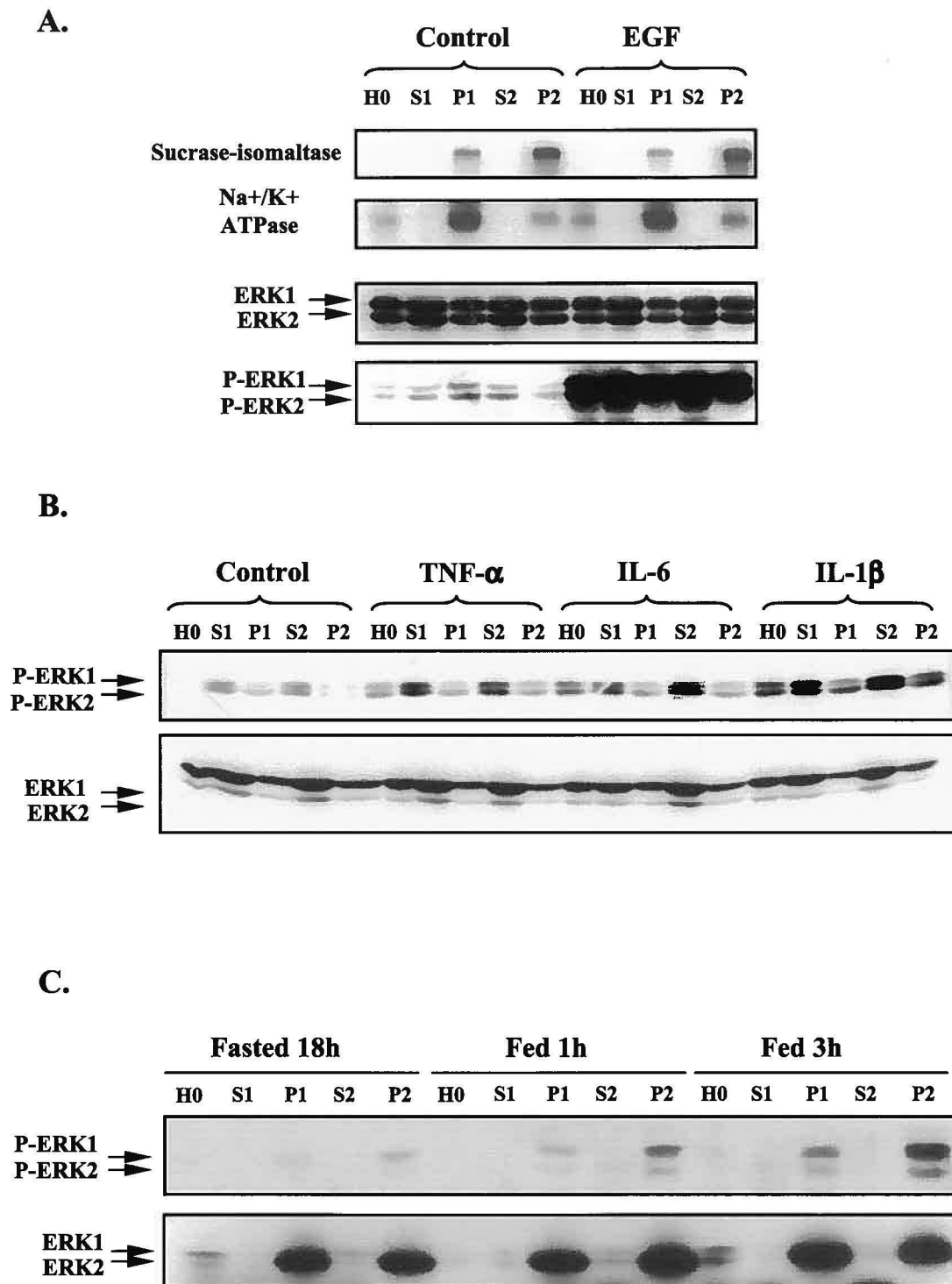
**Figure 3. Evidences of ERK1/2 substrates in enterocyte brush border. A and B.** 25-day post-confluent Caco-2/15 cells were treated for 4 h with UO126 (10  $\mu$ M) and BBMVs were prepared as described in Materials and Methods. Equal amounts of proteins from each fraction were separated by SDS-PAGE. Proteins phosphorylated on serine localized immediately ahead of either a proline or lysine as well as expression of ERK1/2 and phosphorylated ERK1/2 were analyzed by Western blotting. **B.** Equal amounts of proteins from P2 fraction were separated by SDS-PAGE. Actin and proteins phosphorylated on serine localized immediately before either a proline or a lysine were analyzed by Western blotting. **C.** Caco-2/15 cells were harvested at subconfluence (day -2), confluence (day 0) and at day 3, 6, 9 and 12 of post-confluency. Cells were extracted on ice with cold lysis/cytoskeleton stabilization buffer. Soluble (S) and cytoskeleton-associated proteins (I) were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting for E-cadherin and ERK1/2.

**Figure 4. Role of ERK1/2 activity in differentiated intestinal cells.** Caco-2/15 cells were treated from day 0 to day 4 of post-confluence with or without 10  $\mu$ M UO126. Cells were fixed in glutaraldehyde and osmium tetroxide prior to epoxy embedding for electron microscopy analysis. Bars = 4  $\mu$ m for panels 1 and 3 and 333 nm for panels 2 and 4.



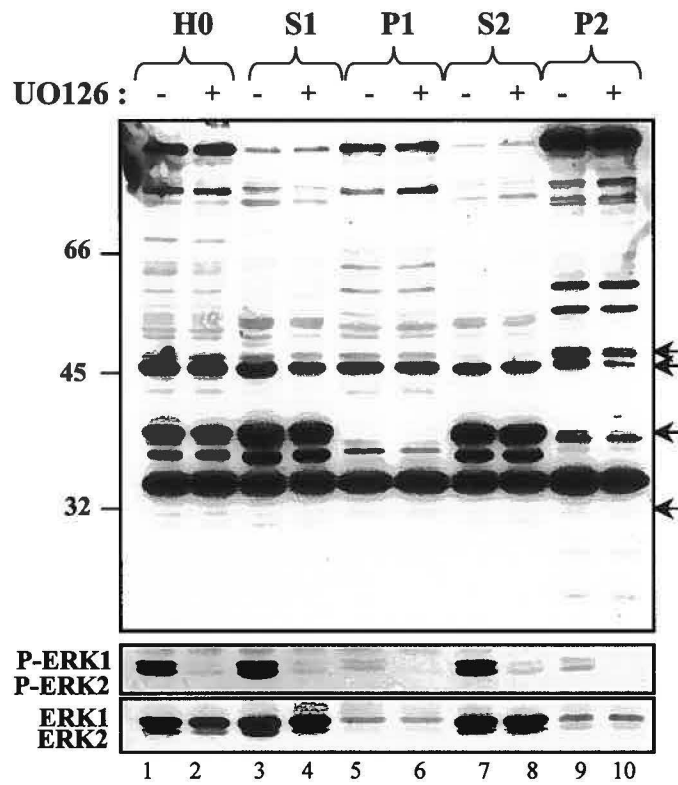


**Figure 1**

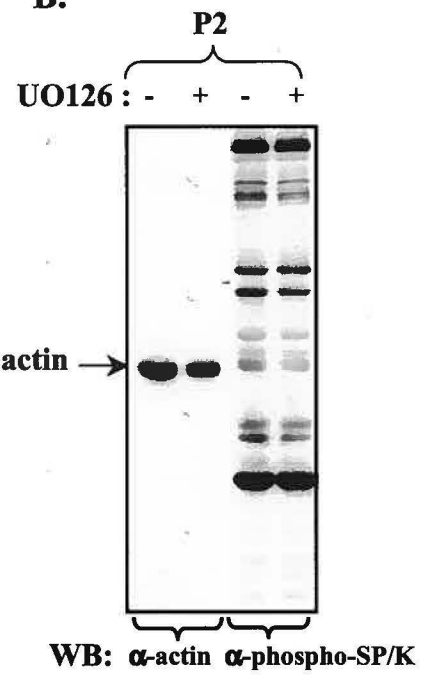


**Figure 2**

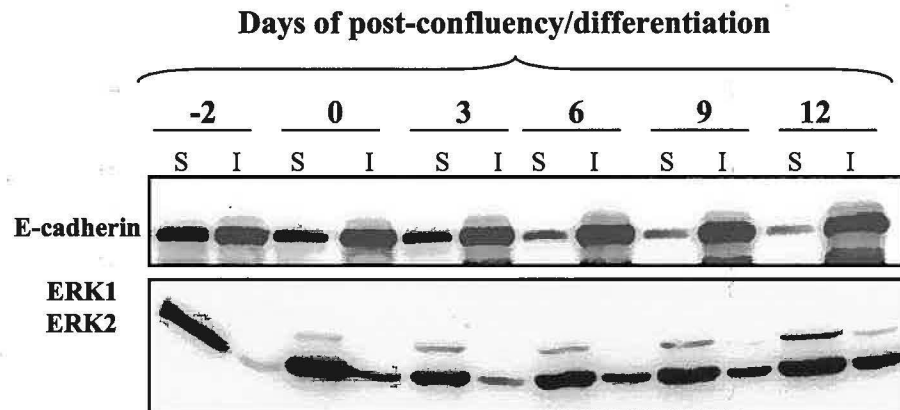
**A.**



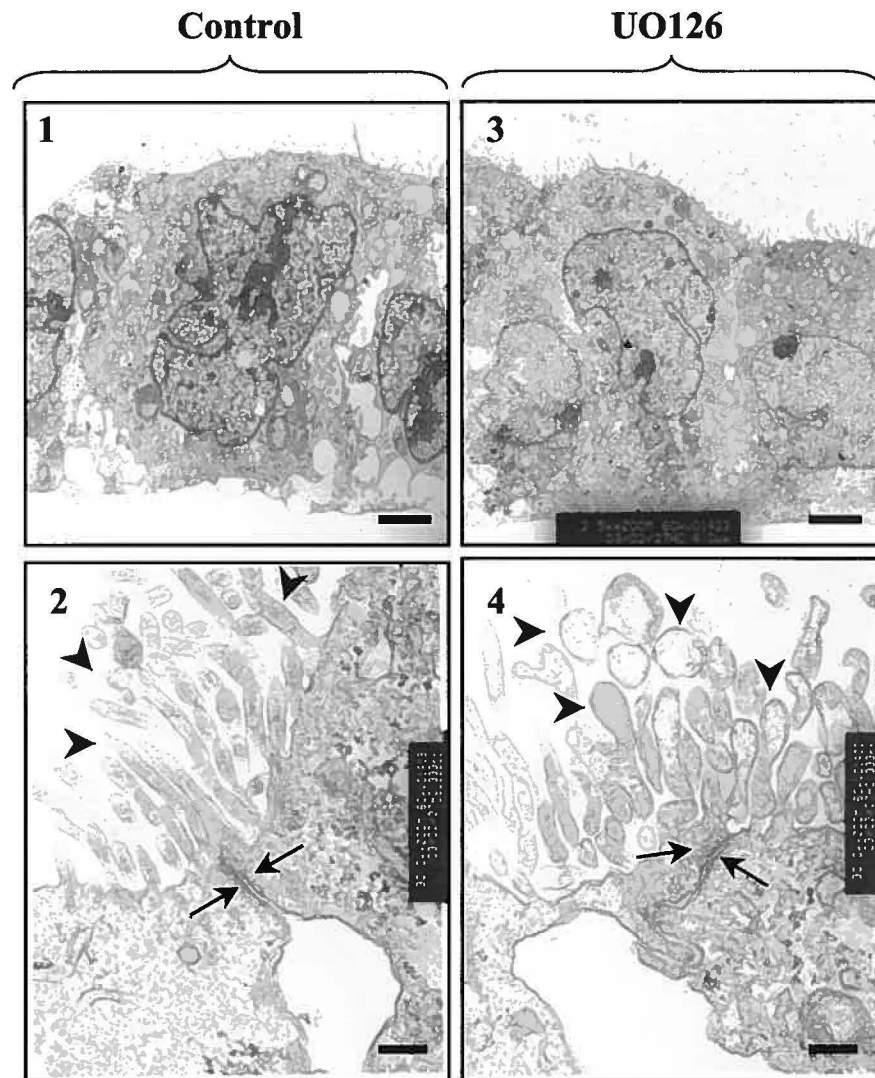
**B.**



**C.**



**Figure 3**



**Figure 4**

### **3. CYCLIC AMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE A NEGATIVELY MODULATES ADHERENS JUNCTION INTEGRITY AND DIFFERENTIATION OF INTESTINAL EPITHELIAL CELLS.**

Marie-Josée Boucher, Patrick Laprise et Nathalie Rivard (2003) *J. Cell. Physiol.* SOUS PRESSE.

La différenciation épithéliale intestinale est un processus complexe impliquant la parfaite coordination de plusieurs voies de signalisation. Une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc a déjà été rapporté pour jouer un rôle négatif dans la différenciation entérocytaire. Cependant, les mécanismes moléculaires et cellulaires empruntés par la cascade AMPc/PKA pour inhiber la différenciation entérocytaire n'ont pas été identifiés. Le présent travail avait pour but de clarifier les effets d'une activation soutenue de la cascade AMPc/PKA sur la différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines. **RÉSULTATS.** Nous montrons que 1- le traitement des cellules Caco-2/15 avec le 8Br-cAMP a inhibé l'expression protéique des marqueurs de différenciation sucrase-isomaltase et villine et a atténué la différenciation morphologique telles que la polarité cellulaire et la formation de bordure en brosse. 2- Le traitement des Caco-2/15 nouvellement confluentes avec le 8Br-cAMP a perturbé la localisation de la E-cadhérine, de l' $\alpha$ -caténine, de la  $\beta$ -caténine et de la F-actine aux sites de contacts cellule-cellule en plus d'amener une diminution de l'association des composants de la jonction adhérente avec le cytosquelette d'actine. 3-

**CYCLIC AMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE A NEGATIVELY MODULATES  
ADHERENS JUNCTION INTEGRITY AND DIFFERENTIATION  
OF INTESTINAL EPITHELIAL CELLS.**

**Marie-Josée Boucher, Patrick Laprise and Nathalie Rivard \***

CIHR Group on Functional Development and Physiopathology of the Digestive Tract,  
Département d'Anatomie et Biologie Cellulaire, Faculty of Medicine, University of Sherbrooke,  
QC, Canada.

**Running title: PKA and intestinal epithelial cell differentiation.**

**Keywords:** PKA, intestinal epithelium, differentiation, adherens junction, E-cadherin  
Running title: cAMP negatively regulates adherens junction integrity

Total number of Figures : 6

Contract grant sponsor : Canadian Institutes of Health Research.  
Contract grant number : MT-14405.

**\* to whom correspondence should be sent:**

**Dr. Nathalie Rivard, Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire, Faculté de  
Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, J1H5N4, Canada.**

Phone: (819) 564-5271

Fax : (819) 564-5320

e-mail: [Nathalie.Rivard@USherbrooke.ca](mailto:Nathalie.Rivard@USherbrooke.ca)

## **ABSTRACT**

Intestinal epithelial cell differentiation is a complex process in which many different signaling pathways are likely involved. An increase in the intracellular levels of cyclic AMP (cAMP) has been shown to inhibit enterocyte differentiation; however, the mechanisms through which cAMP/PKA signaling modulates differentiation of human intestinal epithelial cells are still not well understood. Herein, we report that: 1) treatment of Caco-2/15 cells with 8Br-cAMP repressed sucrase-isomaltase and villin protein expression and strongly attenuated morphological differentiation of enterocyte-like features in Caco-2/15 such as epithelial cell polarity and brush border formation; 2) treatment of confluent Caco-2/15 cells with 8Br-cAMP led to a strong decrease in F-actin localized at cell-cell contact sites along with a reduced amount of E-cadherin and catenins, but not of ZO-1, at cell-cell interfaces concomitant with a decreased association of these proteins with the actin cytoskeleton; 3) inhibition of PKA by H89 prevented disruption of adherens junctions by extracellular calcium depletion; 4) treatment of Caco-2/15 cells with 8Br-cAMP prevented the recruitment and activation of p85/PI-3K to E-cadherin-mediated cell-cell contacts, an important event in the assembly of adherens junctions and differentiation of these cells; 5) E-cadherin appears to be phosphorylated on serine *in vivo* in a PKA-dependent mechanism. Conclusion: Our studies show that cAMP/PKA signaling negatively regulates adherens junction integrity as well as morphological and functional differentiation of intestinal epithelial cells.

## **INTRODUCTION**

The human small intestine is lined with a constantly proliferating and differentiating epithelium in which anchored cells in the crypts of Lieberkühn give rise to proliferating daughter cells that in turn differentiate during migration toward the villus tip. Despite perpetual renewal, a spatially complex epithelium is maintained from crypt to villus tip and from duodenum to colon (Karam, 1999). One of the fundamental challenges in intestinal epithelial cell biology is to define the molecular mechanisms that regulate crypt cell proliferation and the subsequent switch to a well differentiated epithelium.

It has been clearly demonstrated that E-cadherin-mediated cell-cell attachment plays an integral role in the differentiation, polarization and homeostasis of many epithelia (Gumbiner, 1996, Braga et al., 1999; Cereijido et al., 2000), including the intestinal epithelium (Hermiston and Gordon, 1995a; Hermiston and Gordon, 1995b; Hermiston et al., 1996). Cadherins are responsible for cell-cell adhesion through calcium-dependent interaction of their extracellular domains. Their cytoplasmic tails are linked to the cytoskeleton through a complex network of proteins that includes  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -catenins. This link is involved in the strengthening of cell-cell adhesion and in the cohesion of epithelial tissues (Gumbiner, 1996). The importance of cadherins in the renewal of the intestinal epithelium has been demonstrated *in vivo* in a chimeric-transgenic mouse model in which a dominant-negative N-cadherin mutant was expressed in intestinal epithelial cells. Expression of this construct in villus enterocytes alone resulted in the disruption of cell-cell adhesion associated with increased cell migration rate along the crypt-villus axis, loss of differentiated polarized phenotype and increased apoptosis (Hermiston and Gordon, 1995a). When the dominant-negative N-cadherin mutant was expressed



along the entire crypt-villus axis, disrupted cell-cell adhesion resulted in increased proliferation and apoptosis in the crypts and increased migration in the villi (Hermiston and Gordon, 1995b).

Despite the evidence that E-cadherin is necessary for cell-cell adhesion, the underlying molecular mechanisms by which adherens junctions are both positively and negatively controlled by external and cytoplasmic signals are still largely unknown. There is some evidence that cadherin adhesion may be regulated by tyrosine phosphorylation. In cells transfected with the *v-src* oncogene, the observed increased tyrosine phosphorylation of  $\beta$ -catenin and E-cadherin resulted in functional changes such as decreased adhesion and increased migration, without affecting the overall expression of either the catenins or the cadherins (Matsuyoshi et al., 1992; Behrens et al., 1993). Epidermal growth factor (EGF) as well as hepatocyte growth factor have been found to induce  $\beta$ -catenin and  $\gamma$ -catenin tyrosine phosphorylation (Hoschuetzky et al., 1994; Shibamoto et al., 1994). Moreover, well-known protein kinase C inhibitors such as H-7 and staurosporine were found to counteract junction disassembly produced by  $\text{Ca}^{2+}$  depletion (Citi, 1992).  $\beta$ -catenin (Hoschuetzky et al., 1994) and E-cadherin (Pece and Gutkind, 2000) were also found to associate with the EGF receptor. It has also been demonstrated that members of src kinase family are concentrated in the submembranous area of intercellular junctions (Tsukita et al., 1991). We have recently demonstrated that PI-3K interacts with E-cadherin-mediated cell-cell contacts in differentiating enterocytes (Laprise et al., 2002). Thus, the epithelial junction complex contains not only adhesion components but also molecules involved in signal transduction. This close relationship may be functionally important in cell behavior such as epithelial polarization/differentiation, migration and invasion in which assembly/disassembly of adherens and tight junctions occur.

One means of regulating cellular morphology and differentiation is via protein kinase A (PKA) (Schoenwaelder and Burridge, 1999), an enzyme central to many signal transduction pathways (Beebe, 1994). In the present study, the role of cAMP/PKA signaling in intestinal epithelial cells was investigated. Using several approaches, we demonstrate that a significant elevation of intracellular cAMP levels negatively regulates adherens junction integrity and potently inhibits enterocyte differentiation. Our data suggest that E-cadherin may be a specific target for PKA, the presumed mediator of cAMP.

## **MATERIALS AND METHODS**

**Materials :** Monoclonal antibody HIS-14 against sucrase-isomaltase was kindly provided by Dr A. Quaroni (Cornell University, Ithaca, NY). Antibodies raised against villin, E-cadherin,  $\alpha$ -catenin and  $\beta$ -catenin were purchased from Transduction Laboratories (Mississauga, ON, Canada). The anti-ZO-1 antibody was from Zymed Laboratories Inc. (South San Francisco, CA). Antibody directed against the p85/PI-3K regulatory subunit was obtained from Upstate Biotechnology Inc. (Lake Placid, NY). Anti-CREB, anti-phospho-CREB(Ser133) (also recognizing phosphorylation of the CREB-related protein ATF-1), anti-Akt and anti-phospho-Akt(Ser473) were purchased from Cell Signaling (Mississauga, ON, Canada). The anti-phosphoserine antibody (7F12) recognizing serine-phosphorylated proteins in the context of positive or neutral amino acids as PKA, PKB and PKC substrates was from Biomol (Cedarlane, Hornby, ON). Sheep anti-rabbit IgG-FITC and sheep anti-mouse IgG-rhodamine were from Chemicon (Mississauga, ON, Canada). The PKA inhibitor, H89, the Rho kinase inhibitor Y27632 and the inhibitor of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent PKC (cPKC), Gö6976, were purchased from Calbiochem (Mississauga, ON, Canada). Recombinant cAMP-dependent protein kinase (PKA) catalytic subunit was from New England Biolabs (Mississauga, ON, Canada). Recombinant active cdk2/cyclin E complex and recombinant active p38 $\alpha$  and p38 $\beta$  were from Upstate Biotechnologies Inc. [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP and the enhanced chemiluminescence (ECL) immunodetection system were obtained from Amersham Biosciences Inc. (Baie d'Urfé, QC, Canada). Unless otherwise stated, all other materials were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

**Cell culture.** The Caco-2/15 cell line was obtained from Dr A. Quaroni (Cornell University, Ithaca, NY). This clone of the parent Caco-2 cell line (HTB-37; American Type Culture Collection, Manassas, VA) has been extensively characterized elsewhere (Beaulieu and Quaroni, 1991; Deschênes et al., 2001; Laprise et al., 2002; Vachon and Beaulieu, 1992). Caco-2/15 cells were routinely cultured in plastic dishes in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Burlington, ON) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 4 mM glutamine, 20 mM HEPES, 50 units/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin.

**Protein expression and immunoblotting.** Cells were washed twice with ice-cold PBS, lysed in Triton buffer (40 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.2 mM orthovanadate, 40 mM β-glycerophosphate, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 10 µg/ml aprotinin) and cleared of cellular debris by centrifugation (13000 rpm, 10 min, 4°C). Protein concentrations were measured using the Bicinchoninic acid reagent (BCA) from Pierce (Rockford, Illinois, USA). Proteins were separated by SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) and proteins detected immunologically after electrotransfer onto nitrocellulose membranes. Blots were incubated with specific antibodies in blocking solution for 2-4 h at 25°C followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Blots were visualized by the Amersham Enhanced chemiLuminescence system.

**Electronic microscopy.** Cell cultures were rinsed with PBS, prefixed for 15 min with a 1:1 mixture of culture medium (DMEM) and freshly prepared 2.8% glutaraldehyde in cacodylate buffer (0.1M cacodylate and 7.5% sucrose), and then fixed for 30 min with 2.8% glutaraldehyde at room temperature. After two rinses, specimens were post-fixed for 60 min with 2% osmium

tetroxide in cacodylate buffer. Samples were then dehydrated using increasing ethanol concentrations (40, 70, 90, 95, 100%; three times each) and covered twice for 3h with a thin layer of Araldite 502 resin (for ethanol substitution). Thereafter, the resin was allowed to polymerize at 60°C for 48 h. Thin sections were prepared using an LKB ultramicrotome, contrasted with lead citrate and uranyl acetate, and observed on a JEOL 100CX transmission electron microscope. All reagents were purchased from Electron Microscopy Sciences (Cedarlane, Hornby, ON).

***Immunofluorescence Microscopy.*** Caco-2/15 cells grown on sterile glass coverslips were washed twice with ice-cold PBS, fixed with 30% methanol/70% acetone for 20 min at -20°C, and blocked with 2% bovine serum albumin in PBS for 30 min at room temperature. Cells were then immunostained for 2 h with the primary antibody in blocking solution and for 30 min with the secondary antibody. For F-actin staining, fixed cells were incubated with 1 µg/ml FITC-phalloidin for 30 min. Negative controls (no primary antibody) were included in all experiments.

***Isolation of cytoskeleton-associated proteins.*** Cells were washed twice with ice-cold PBS and lysed in cytoskeleton stabilization buffer (0.5% Triton X-100, 50 mM NaCl, 10 mM PIPES pH 6.8, 300 mM sucrose, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM orthovanadate, 10 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 10 µg/ml aprotinin) as previously described (Laprise et al., 2002; Boucher and Rivard, 2003). The cytoskeleton-associated proteins (insoluble fraction) were harvested by centrifugation (13000 rpm at 4°C for 20 min) and solubilized in Laemmli buffer (62.5 mM Tris pH 6.8, 5% β-mercaptoethanol, 2.3% SDS, 1 mM PMSF). Protein concentrations were measured using the modified Lowry procedure (Peterson, 1977).

***Immunoprecipitation.*** Immunoprecipitation was conducted as described previously (Laprise et al., 2002).

***Inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell contacts (Calcium-switch experiments).*** Two-day post-confluent Caco-2/15 cells were serum-starved for 16 h in DMEM supplemented with 20 mM HEPES, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 4 mM glutamine. The adherens junctions were disrupted by treatment with 4 mM EGTA for 30 min at 37°C. Intercellular contacts were subsequently allowed to re-establish by restoration of extracellular calcium concentrations by substituting EGTA-containing medium with fresh medium (1.8 mM CaCl<sub>2</sub>) (Laprise et al., 2002). In some experiments, H89 (10 µM) was initially co-added with EGTA then maintained in the fresh medium. After selected time intervals of calcium restoration, cells were washed twice with ice-cold PBS and either lysed in Triton buffer to detect phosphorylated and total Akt or fixed for immunofluorescence.

***GST-E-cadherin phosphorylation assay.*** Kinase assays were performed using the kinase buffer supplied or as described by the manufacturer for each recombinant kinase. Briefly, appropriate kinase buffers were supplemented with 200 µM ATP, 1 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 5 µg of GST-E-cadherin (Reuver and Garner, 1998) and the appropriate recombinant kinase and incubated at 30°C for 30 min. Reactions were stopped by addition of Laemmli buffer. Radiolabelled GST-E-cadherin was separated by SDS-PAGE and processed for autoradiography.

## **RESULTS**

### **8Br-cAMP inhibits differentiation of human intestinal epithelial cells Caco-2/15.**

The impact of elevated intracellular concentrations of cAMP on the spontaneous enterocytic differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2/15 was first examined by using the non-hydrolysable but diffusible cAMP analog, 8Br-cAMP. The Caco-2/15 cell line provides a unique and well characterized model for the study of intestinal epithelial differentiation as these cells undergo cell cycle arrest and differentiation to a small-bowel phenotype with microvilli, dome formation and the expression of sucrase-isomaltase several days after reaching confluence (Beaulieu and Quaroni, 1991; Deschênes et al., 2001; Laprise et al., 2002; Vachon and Beaulieu, 1992). To impede any effects on cell cycle progression and to determine whether cAMP signaling specifically regulates the differentiation process, 1 mM 8Br-cAMP was added every day, starting at confluency (day 0). As shown in Fig. 1A, daily addition of 1 mM 8Br-cAMP enhanced phosphorylation of both CREB and ATF-1, a CREB-related protein, two known substrates of PKA (Montminy, 1997), in confluent Caco-2/15 cells. By contrast, 8Br-cAMP treatment repressed sucrase-isomaltase expression and strongly attenuated the expression of villin, two enterocyte differentiation markers (Fig. 1B). These effects were not due to an increase in apoptosis since neither DNA fragmentation nor PARP cleavage were observed in 8Br-cAMP-treated Caco-2/15 cells (data not shown).

Caco-2/15 cell cultures were also characterized by transmission electron microscopy at day 14 post-confluency. As shown in Fig. 1C (panels 1 and 3), post-confluent Caco-2/15 cells exhibited ultrastructural characteristics similar to that found in intact villus epithelium, including well-organized brush border and typical junctional complexes. Treatment of confluent Caco-2/15 cells with 8Br-cAMP remarkably affected cell morphology and brush

border formation. Indeed, 8Br-cAMP-treated cells exhibited a less polarized, flat phenotype compared to untreated cells (Fig. 1C, panels 1 and 2). Brush border morphology was markedly altered, as visualized by a reduction in the length and number of microvilli (Fig. 1C, panels 3 and 4). In addition, 8Br-cAMP treated cells exhibited poorly defined apical junctional complexes (Fig. 1C, panel 4). Taken together, these results indicate that cAMP signaling negatively regulates functional and morphological differentiation of intestinal epithelial cells.

### **8Br-cAMP negatively regulates adherens junction integrity.**

The above observation that 8Br-cAMP-treated cells exhibited a less polarized and differentiated phenotype as well as poorly defined apical junctions prompted to further investigate whether 8Br-cAMP might control expression and localization of adherens and tight junction proteins since cell-cell adhesion plays a crucial role in the polarization and differentiation of epithelial cells (Takeichi, 1995). In this series of experiments, E-cadherin,  $\alpha$ -catenin,  $\beta$ -catenin and ZO-1 staining was examined in both untreated and 8Br-cAMP-treated confluent Caco-2/15 cells after 24 h. As shown in Fig. 2A (panels 1-4), untreated cells showed typical honeycomb E-cadherin,  $\alpha$ -catenin,  $\beta$ -catenin and ZO-1 staining localized at sites of cell-cell contact. E-cadherin,  $\alpha$ -catenin and  $\beta$ -catenin staining in 8Br-cAMP-treated cells, on the other hand, was more diffuse along cell-cell contacts, although labeling at the actual contact area was still observed (Fig. 2A, panels 5-7). This phenomenon appeared to be specific to adherens junction proteins since ZO-1 staining was not altered by 8Br-cAMP treatment (Fig. 2A, panel 8). Western blot analysis confirmed that these modulations occurred without any change in total amount of E-cadherin,  $\beta$ -catenin or  $\alpha$ -catenin proteins, even after 3 days of 8Br-cAMP treatment (Fig. 2B). Of note, however, an additional protein species of low electrophoretic mobility



detected with E-cadherin antibody was also prominent in 8Br-cAMP lysate proteins (Fig. 2B, see arrowhead). This protein species is most likely phosphorylated E-cadherin as clearly demonstrated further in the manuscript.

In previous studies, E-cadherin and catenins associated with functional adherens junctions were shown to be linked to the cytoskeleton (Hülsken et al., 1994; Laprise et al., 2002) and thus cannot be extracted with a 0.5 % solution of the nonionic detergent Triton X-100, but are found in the insoluble fraction. As previously demonstrated (Laprise et al., 2002; Boucher and Rivard, 2003), the proportion of E-cadherin and catenins associated with the cytoskeleton was enhanced when cells reached confluence (day 0) and further increased at day 3 post-confluence (Fig. 3A). Addition of 8Br-cAMP at confluency (day 0) prevented any further increase in E-cadherin and catenin association with the cytoskeleton as observed after 3 days of treatment in newly confluent Caco-2/15 cells (Fig. 3A). Total amounts of either protein remained comparable (Fig. 2B). This indicates that 8Br-cAMP inhibits association of adherens junction proteins with the cytoskeleton occurring early after confluency.

F-actin organization was also examined following 8Br-cAMP treatment in newly confluent Caco-2/15 cells. As shown in Fig. 3B (panels 1 and 2), addition of 8Br-cAMP led to F-actin disorganization at the cell periphery. Indeed, in cells exposed to 8Br-cAMP, actin appears irregularly distributed in brightly fluorescent aggregates. Inhibition of PKA with the pharmacological inhibitor H89 (Chijiwa and al., 1990) prevented the effects of 8Br-cAMP on E-cadherin and F-actin labeling (Fig. 3B, panels 4 and 8). Furthermore, two studies recently reported that H89 can also inhibit Rho kinase (Davies et al., 2000; Leemhuis et al., 2002), a well known modulator of actin cytoskeleton (Kaibuchi et al., 1999). To exclude the possible involvement of Rho kinase, the effects of Y27632, a pharmacological specific inhibitor of Rho kinase, was tested on confluent Caco-2/15 cells. Addition of Y27632 (both at 10  $\mu$ M and at a

higher concentration of 50  $\mu$ M) did not modify the action of 8Br-cAMP on E-cadherin localization and F-actin organization (data not shown). Hence, these results indicate 8Br-cAMP alters the microfilament network and inhibits E-cadherin and catenins association with the cytoskeleton in a PKA-dependent manner.

To further analyze the role of PKA in adherens junction assembly, a calcium-switch experiment was performed, in which adherens junctions of confluent Caco-2/15 cells were first disrupted by chelating extracellular calcium, then subsequently allowed to re-establish by restoration of extracellular calcium (Laprise et al., 2002) in the presence or absence of H89. As shown in Fig. 4 (panel 1), untreated cells exhibited typical honeycomb E-cadherin staining. After a 30-min EGTA treatment, cells became rounded and E-cadherin staining formed a diffuse ring at the cell periphery (Fig. 4, panel 2). Following calcium restoration, E-cadherin was redistributed at the sites of cell-cell contact, and cells reacquired their typical epithelial morphology (Fig. 4, panel 3), indicating that adherens junctions were almost completely reorganized. However, in the presence of H89, most immunoreactive E-cadherin remained at cell-cell contact sites even in the presence of EGTA (Fig. 4, panels 4 and 5), suggesting that PKA activity may be involved in adherens junction disruption occurring during chelation of extracellular calcium. By contrast, addition of the inhibitor of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent PKC, Gö6976, or the MEK inhibitors, PD98059 or UO126, did not influence the typical E-cadherin re-distribution during adherens junction disruption/reformation in calcium-switch experiments (data not shown).

#### **8Br-cAMP prevents E-cadherin-induced recruitment and activation of p85/PI-3K at sites of cell-cell contact.**

We have recently demonstrated that E-cadherin engagement recruits and activates PI-3K signaling in intestinal epithelial cells, and this activation appears to be essential for

integrity of adherens junctions and association with the cytoskeleton (Laprise et al., 2002). Indeed, removal of calcium from the culture media of newly confluent Caco-2/15 cells resulted in junction disruption and decreased AKT phosphorylation (Laprise et al., 2002). In this study, we examined whether 8Br-cAMP interferes with the recruitment of p85/PI-3K to E-cadherin-mediated cell-cell contacts. As reported earlier (Laprise et al., 2002), E-cadherin and p85/PI-3K were found homogeneously co-localized at the cell-cell interfaces in confluent Caco-2/15 cells (Fig. 5A, panels 1-3, see arrows). By contrast, following 8Br-cAMP treatment, E-cadherin staining was diffuse at the cell periphery while most p85/PI-3K staining was found in the cytoplasm with less co-localization found between either protein (Fig. 5A, panels 4-6).

We also reported that E-cadherin engagement leads to a PI-3K-dependent activation of AKT (Laprise et al., 2002). Since H89 prevented adherens junction disruption induced by calcium removal, we verified whether the PKA inhibitor also prevents AKT inhibition usually observed following calcium depletion (Laprise et al., 2002). As shown in Fig. 5B, the PKA inhibitor not only prevented adherens junction disruption (see Fig. 4) but also the concomitant inhibition of AKT phosphorylation (Fig. 5B). Conversely, treatment of confluent Caco-2/15 cells with 8Br-cAMP clearly inhibited AKT phosphorylation levels without affecting total AKT expression (Fig. 5C). Overall, these results suggest that increased levels of cAMP negatively controls E-cadherin-induced PI-3K recruitment and its activation at cell-cell contact sites.

### **PKA-dependent phosphorylation of E-cadherin**

Western blot analysis of E-cadherin in 8Br-cAMP-treated cells consistently revealed a slower migrating form of E-cadherin (see Fig. 2B), suggesting that E-cadherin may be phosphorylated in these cells. In a first attempt to verify E-cadherin phosphorylation, confluent

Caco-2/15 cells were treated with 8Br-cAMP, followed by immunoprecipitation of E-cadherin and by immunoblotting with an antibody specifically recognizing proteins phosphorylated on a serine residue located in the vicinity of positive or neutral amino acids such as PKA, PKB and PKC substrates (Kennelly and Krebs, 1991). As shown in Fig. 6A, 8Br-cAMP treatment of confluent Caco-2/15 cells significantly increased phosphorylation of E-cadherin on serine residues. This slow migrating phosphorylated form of E-cadherin was not detected when the PKA inhibitor was added to 8Br-cAMP-treated cells (Fig. 6B). Since this anti-phosphoserine antibody can also detect PKC substrates and since there is possible cross-talk between PKA and PKC signaling (Robinson-White and Stratakis, 2002), the PKC inhibitor Gö6976 was used to analyze the contribution of PKC in E-cadherin phosphorylation in 8Br-cAMP-treated cells. In contrast to H89, neither Gö6976 nor the Rho kinase inhibitor Y27632 were able to prevent the accumulation of the slow migrating phosphorylated form of E-cadherin after 8Br-cAMP treatment (Fig. 6B). These results suggest that E-cadherin may be phosphorylated *in vivo* in a PKA-dependent mechanism. An *in vitro* kinase assay using a bacterially-expressed cytoplasmic tail of E-cadherin fused to GST protein and recombinant active PKA revealed that PKA was indeed able to potently phosphorylate the cytoplasmic tail of E-cadherin to significant levels (Fig. 6C). No phosphorylation of E-cadherin was observed with recombinant active p38 $\alpha$  and p38 $\beta$  or recombinant active cyclin E/cdk2 complex (Fig. 6C). This confirms that E-cadherin may be a specific and direct target for PKA.

In an attempt to evaluate the impact of E-cadherin phosphorylation on junction integrity, the interaction of phosphorylated E-cadherin was examined with its direct partner  $\beta$ -catenin. Confluent Caco-2/15 cells were treated with 8Br-cAMP and extracts subjected to immunoprecipitation using  $\beta$ -catenin antibody. The components of the immune complexes were

resolved by gel electrophoresis and transferred onto a membrane probed with E-cadherin antibody and  $\alpha$ -catenin. As shown in Fig. 6D, E-cadherin and  $\alpha$ -catenin were seen to co-immunoprecipitate with  $\beta$ -catenin in control and 8Br-cAMP-treated confluent Caco-2/15 cells. Of note, the slower migrating phosphorylated form of E-cadherin observed in 8Br-cAMP-treated cells was well detected in  $\beta$ -catenin immunoprecipitates suggesting that this phosphorylated form of E-cadherin is able to interact with catenins.

## **DISCUSSION**

In the present study, we were able to demonstrate the inhibitory effect of high intracellular concentrations of cAMP on functional and morphological differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2/15. Indeed, treatment of cells with 8Br-cAMP decreased the expression of the enterocyte markers sucrase-isomaltase and villin, and reduced cell polarization and brush border formation. Previous studies had also pointed out this crucial role of cAMP signaling on the control of enterocyte differentiation. When Caco-2 cells were adapted to grow in the continuous presence of forskolin, a direct activator of adenylate cyclase, several characteristic features of differentiated Caco-2 cells were impaired, including reduced apical expression of brush border hydrolases, shortened microvilli, and disappearance of intercellular spaces (Baricault, et al., 1995; Rousset et al., 1989, 1985). However, it has been suggested that forskolin likely acts through a cAMP-independent mechanism, since 8Br-cAMP does not reproduce these perturbations (Sapin et al., 1997). Nevertheless, it has been demonstrated that treatment of Caco-2 cells with 8Br-cAMP decreases dipeptidyl peptidase specific activity, suggesting that intracellular cAMP may negatively regulate intestinal epithelial cell differentiation (Basson and Fu, 1996). In addition, higher adenylate cyclase activity was observed in undifferentiated crypt epithelial cells in comparison with differentiated villus cells in rat small intestine (Quill and Weiser, 1975).

Herein, we provide evidence that cAMP-PKA pathway may impair enterocyte differentiation by interfering with adherens junction integrity: 1) treatment of confluent Caco-2/15 cells with 8Br-cAMP led to a strong decrease in F-actin localized at cell-cell contact sites. The hypothesis that E-cadherin-mediated cell-cell contacts were also affected following 8Br-cAMP was confirmed by the reduced amount of E-cadherin and catenins, but not of ZO-1,

observed at cell-cell interfaces concomitant with a decreased association of these proteins with the actin cytoskeleton; 2) inhibition of PKA by H89 prevented disruption of adherens junctions by extracellular calcium depletion; 3) and more importantly, 8Br-cAMP prevented the recruitment of p85/PI-3K to E-cadherin-mediated cell-cell contacts, an important event for the assembly and integrity of adherens junction in various epithelial cell types (Somasiri et al., 2000; Kovacs et al., 2002; Laprise et al., 2002; Hollande et al., 2003) and for morphological and functional differentiation of intestinal epithelial cells (Laprise et al., 2002). Our findings thus support the hypothesis that cAMP/PKA signaling negatively regulates adherens junction integrity, actin organization and enterocyte differentiation by preventing PI-3K recruitment and activation to E-cadherin-mediated cell-cell contact sites. However, as observed following PI-3K inhibition (Laprise et al., 2002), 8Br-cAMP does not affect tight junction integrity of confluent Caco-2/15 cells since localization of ZO-1 at cell-cell contact sites was not affected by 8Br-cAMP treatment.

The molecular mechanism by which cAMP/PKA impairs adherens junctions is unknown. Several studies have reported that actin cytoskeleton may be a target of cAMP/PKA signaling. For instance, direct phosphorylation of the actin protein by PKA was found to inhibit actin polymerization (Otha et al., 1987). PKA has also been shown to antagonize microfilament integrity by directly phosphorylating and inhibiting myosin light chain kinase (Lamb et al., 1988). Furthermore, administration of forskolin or 8Br-cAMP to lymphocytes stimulated morphological changes strikingly similar to those observed upon introduction of the Rho-specific inhibitor C3-transferase (Lang et al., 1996). From this original observation, cAMP- and cGMP-dependent kinase (PKA and PKG) were demonstrated to phosphorylate and inhibit RhoA (Lang et al., 1996, Sawada et al., 2001; Ellerbroek et al., 2003), a small G protein which can cause dramatic rearrangement of the actin cytoskeleton when in its active GTP-bound state (Kaibuchi et

al., 1999). Herein, we excluded the implication of the effector kinases, Rho kinases, in 8Br-cAMP-mediated effects since the pharmacological inhibitor Y27632 did not influence adherens junction integrity in confluent Caco-2/15 cells. By contrast, one cannot exclude the possibility that in 8Br-cAMP-treated Caco-2/15 cells, PKA phosphorylates and inhibits RhoA leading to inhibition of Dial1, shown to be crucial for the localization of adherens junction components to the cell periphery. However, inhibition of Rho or Dial1 resulted in the accumulation of  $\alpha$ -catenin in vesicle-like structures and a disruption of  $\alpha$ -catenin and  $\beta$ -catenin/E-cadherin complex (Sahai and Marshall, 2002). In the present study, stimulation of cAMP/PKA signaling did not disrupt the  $\alpha$ -catenin/ $\beta$ -catenin complex or induce a punctuate distribution of  $\alpha$ -catenin, demonstrating that cAMP/PKA signaling may act through another pathway. Of interest, in cells exposed to cytochalasin D, actin appeared irregularly distributed in brightly fluorescent aggregates, in a quite similar manner than following 8Br-cAMP treatment (Kovbasnjuk et al., 1998). In addition, disruption of F-actin microfilaments with cytochalasin D resulted in a loss of adherens junction components at cell-cell contacts, but did not affect the formation of cadherin/catenin complexes (Sahai and Marshall, 2002). Therefore, it is likely that cAMP/PKA signaling induces a disturbance of adherens junction integrity by loss of the connectivity between E-cadherin and catenins to the cytoskeleton but not by loss of expression of E-cadherin or catenin molecules. Indeed, the ability of the PKA inhibitor to prevent disruption of adherens junction components from cell-cell contact sites correlates well with its ability to inhibit disorganization of the actin network and prevent inhibition of PI-3K/AKT signaling. Other studies have found a requirement for actin polymerization in cell junction formation; in particular, disruption of cortical actin filaments (Quinlan and Hyatt, 1999) and blockade of Mena/VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein) (Vasioukhin et al., 2000) prevent the correct formation of adherens junctions.



VASP has recently been demonstrated to be localized in cellular membranes of intestinal epithelial cells (Gambaryan et al., 2001). Furthermore, actin nucleation and F-actin binding ability of VASP can be negatively modulated by PKA phosphorylation (Harbeck et al., 2000). More importantly, PI-3K products have been shown to positively regulate VASP function (Huttelmaier et al., 1998). One could therefore speculate that the combined phosphorylation of VASP by PKA and lack of PI-3K products at the sites of cell-cell contact could be involved in the negative regulation of adherens junction integrity by cAMP/PKA signaling.

The complexity of adherens junction regulatory mechanisms is further emphasized by the recent work of Barbosa et al. (2003), who demonstrated that stimulation of PKC by the phorbol ester TPA in the parental cell line Caco-2 also resulted in disassembly of adherens junctions, but not of tight junctions. Based on these results, they concluded that the ERK pathway is involved in TPA-induced cell signaling for modulation of cadherin-dependent cell-cell adhesion and cell shape in Caco-2 cells. Herein, we believe that the ERK and PKC (at least cPKC and nPKC subfamilies) pathways were not directly involved in cAMP/PKA-dependent effects on adherens junction integrity since 1- the MEK inhibitors, PD98059 and UO126, and the inhibitor of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent PKC, Gö6976, had no effect on adherens junction assembly/disassembly in calcium-switch experiments; 2- in contrast to TPA which decreased E-cadherin expression levels (Barbosa et al., 2003), 8Br-cAMP did not influence total expression of E-cadherin and catenins. However, at this point, further studies are necessary to clearly define the distinct roles of PKA, PKC and ERK in the control of intestinal cell-cell adhesion.

A novel finding of this study is that E-cadherin was phosphorylated on serine in 8Br-cAMP-treated cells and that this phosphorylation appeared to be mediated by PKA. The phosphorylation of E-cadherin on tyrosine which inhibits E-cadherin adhesive properties has been reported by a number of investigators (Daniel and Reynolds, 1997). By contrast, few studies

demonstrated serine/threonine phosphorylation of E-cadherin. Serres et al. (2000) hypothesized that phosphorylation of E-cadherin in its  $\beta$ -catenin binding domain by casein kinase II is necessary for E-cadherin interaction with  $\beta$ -catenin. Indeed, they showed that mutation of 8 serine residues in a 30 amino acid core region necessary for catenin binding in the E-cadherin cytoplasmic domain induced a loss of cell-cell adhesion (Stappert and Kemler, 1994). Our present findings indicate that E-cadherin may be a target for PKA in 8Br-cAMP-treated cells. Hence, one could speculate that phosphorylation of E-cadherin could result in its dissociation from catenin proteins and/or from the actin cytoskeleton. However, we found phosphorylated E-cadherin and  $\alpha$ -catenin in  $\beta$ -catenin immunoprecipitates, indicating that PKA-dependent phosphorylation of E-cadherin did not modulate its interaction with catenins. Therefore, at this point, further studies are required to verify whether E-cadherin serine phosphorylation can in fact modulate its adhesive properties. Of particular interest is that PKA has recently been shown to phosphorylate ZO-2, a tight junction-associated protein, restraining its ability to operate at the junctional complex level (Avila-Flores et al., 2001).

In conclusion, our studies show that cAMP negatively regulates adherens junction integrity and intestinal epithelial cell differentiation. This finding has significant implications on our understanding of normal turnover of the intestinal epithelium. The differentiation process is indeed accompanied by a decrease in the capacity to generate cAMP after agonist stimulation (Amelsberg et al., 1996), although the physiological significance of this finding has remained unclear. Our data suggest the concept that attenuation of cAMP generation is a contributory step in overcoming the negative action of cAMP on adherens junction assembly and integrity, thereby facilitating the normal morphological and functional differentiation of enterocytes.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank P. Pothier for the critical reading of the manuscript. We thank Dr. James Nelson (Stanford University) for the GST-E-cadherin construct. This research was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MT-14405 to NR). N.R. is a recipient of a Canadian Research Chair in Signaling and Digestive Physiopathology. M.J.B. and P.L. are student scholars from the Fonds pour la Recherche en Santé du Québec.

## **REFERENCES**

Amelsberg M, Amelsberg A, Ainsworth MA, Hogan DL, Isenberg JI. 1996. Cyclic adenosine-3',5'-monophosphate production is greater in rabbit duodenal crypt than in villus cells. *Scand J Gastroenterol* 31:233-239.

Avila-Flores A, Rendon-Huerta E, Moreno J, Islas S, Betanzos A, Robles-Flores M, Gonzalez-Mariscal L. 2001. Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosphorylation by protein kinase C. *Biochem J* 360:295-304.

Barbosa LA, Goto-Silva L, Redondo PA, Oliveira S, Montesano G, de Souza W, Morgado-Diaz, JA. 2003. TPA-induced signal transduction: a link between PKC and EGFR signaling modulates the assembly of intercellular junctions in Caco-2 cells. *Cell Tissue Res* 312:319-31.

Baricault L, Fransen JAM, Garcia M, Sapin C, Codogno P, Ginsel LA, Trugnan G. 1995. Rapid sequestration of DPP IV/CD26 and other cell surface proteins in an autophagic-like compartment in Caco-2 cells treated with forskolin. *J Cell Sci* 108 : 2109-2121.

Basson MD, Fu H. 1996. Regulation of human Caco-2 intestinal epithelial brush border enzyme activity by cyclic nucleotides. *Cancer Lett* 99:155-160.

Beaulieu JF, Quaroni A. 1991. Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem J* 280:599-608.

Beebe SJ. 1994. The cAMP-dependent protein kinases and cAMP signal transduction. *Semin Cancer Biol* 5:285-294.

Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, Van Roy F, Mareel MM, Birchmeier W. 1993. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol* 120:757-766.

Boucher MJ, Rivard N. 2003. Regulation and role of brush border-associated ERK1/2 in intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 311:121-128.

Braga VM, Del Maschio A, Machesky L, Dejana E. 1999. Regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context. *Mol Biol Cell* 10:9-22.

Cereijido M, Shoshani L, Contreras RG. 2000. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G477-482.

Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H. 1990. Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cAMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 265: 5257-5272.

Citi S. 1992. Protein kinase inhibitors prevent junction dissociation induced by low extracellular calcium in MDCK epithelial cells. *J Cell Biol* 117:169-178.

Daniel JM, Reynolds AB. 1997. Tyrosine phosphorylation and cadherin-catenin function. *Bioessays* 19: 883-891.

Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J* 351: 95-105.

Deschênes C, Vézina A, Beaulieu JF, Rivard N. 2001. Role of p27<sup>kip1</sup> in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* 120: 423-438.

Ellerbroek SM, Wennerberg K, Burridge K. 2003. Serine phosphorylation negatively regulates RhoA *in vivo*. *J Biol Chem* 278: 19023-19031.

Gambaryan S, Hauser W, Kobsar A, Glazova M, Walter U. 2001. Distribution, cellular localization, and postnatal development of VASP and Mena expression in mouse tissues. *Histochem Cell Biol* 116: 535-543.

Gumbiner BM. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84: 345-357.

Harbeck B, Huttelmaier S, Schluter K, Jockusch BM, Illenberger S. 2000. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J Biol Chem* 275: 30817-30825.

Hermiston ML, Gordon JI. 1995a. In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 129: 489-506.

Hermiston ML, Gordon JI. 1995b. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant-negative N-cadherin. *Science* 270: 1203-1207.

Hermiston ML, Wong MH, Gordon JI. 1996. Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system. *Genes Dev* 10: 985-996.

Hollande F, Lee DJ, Choquet A, Roche S, Baldwin GS. 2003. Adherens junctions and tight junctions are regulated via different pathways by progastrin in epithelial cells. *J Cell Sci* 116:1187-1197.

Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R. 1994. Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* 127:1375-1380.

Hulsken J, Birchmeier W, Behrens J. 1994. E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol* 127:2061-2069.

Huttelmaier S, Mayboroda O, Harbeck B, Jarchau T, Jockusch BM, Rudiger M. 1998. The interaction of the cell-contact proteins VASP and vinculin is regulated by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Curr Biol* 8: 479-488.

Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. 1999. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 68: 459-486.

Karam SM. 1999. Lineage commitment and maturation of epithelial of the gut. *Front Biosci* 4:D286-298.

Kennelly PJ, Krebs EG. 1991. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 266: 15555-15558.

Kovacs EM, Ali RG, McCormack AJ, Yap AS. 2002. E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts. *J Biol Chem* 277:6708-6718.

Kovbnasnjuk ON, Szmulowicz U, Spring KR. 1998. Regulation of the MDCK cell tight junction. *J Membrane Biol* 161:93-104.

Lamb NJ, Fernandez A, Conti MA, Adelstein R, Glass DB, Welch WJ, Feramisco JR. 1988. Regulation of actin microfilament integrity in living nonmuscle cells by the cAMP-dependent protein kinase and the myosin light chain kinase. *J Cell Biol* 106:1955-1971.



Lang P, Gesbert F, Delespine-Charmagnat M, Stancou R, Pouchelet M, Bertoglio J. 1996. Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J* 15:510-519.

Laprise P, Chailier P, Houde M, Beaulieu JF, Boucher MJ, Rivard N. 2002. Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 277: 8226-8234.

Leemhuis J, Boutillier S, Schmidt G, Meyer DK. 2002. The protein kinase A inhibitor H89 acts on cell morphology by inhibiting Rho kinase. *J Pharm Exp Therap* 300: 1000-1007.

Matsuyoshi N, Hamaguchi M, Taniguchi S, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M. 1992. Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J Cell Biol* 118:703-714.

Montminy M. 1997. Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu Rev Biochem* 66: 807-822.

Otha Y, Akiyama T, Nishida E, Sakai H. 1987. Protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase induce opposite effects on actin polymerizability. *FEBS Lett* 222: 305-310.

Pece S, Gutkind JS. 2000. Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *J Biol Chem* 275: 41227-41233.

Peterson GL. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83: 346-356.

Quill H, Weiser MM. 1975. Adenylate and guanylate cyclase activities and cellular differentiation in rat small intestine. *Gastroenterology* 69: 470-478.

Quinlan MP, Hyatt JL. 1999. Establishment of the circumferential actin filament network is a prerequisite for localization of the cadherin-catenin complex in epithelial cells. *Cell Growth Differ* 10:839-854.

Reuver SM, Garner CC. 1998. E-cadherin mediated cell adhesion recruits SAP97 into the cortical cytoskeleton. *J Cell Sci* 111:1071-1080.

Robinson-White A, Stratakis CA. 2002. Protein kinase A signaling: "cross-talk" with other pathways in endocrine cells. *Ann N Y Acad Sci* 968: 256-270.

Rousset M, Laburthe M, Pinto M, Chevalier G, Rouyer-Fessard C, Dussaulx E, Trugnan G, Boige N, Brun JL, Zweibaum A. 1985. Enterocytic differentiation and glucose utilization in the human colon tumor cell line Caco-2 : modulation by forskolin. *J Cell Physiol* 123: 377-385.

Rousset M, Chantret I, Darmoul D, Trugnan G, Sapin C, Green F, Swallow D, Zweibaum A. 1989. Reversible forskolin-induced impairment of sucrase-isomaltase mRNA levels,

biosynthesis, and transport to the brush border membrane in Caco-2 cells. *J Cell Physiol* 141: 627-635.

Sahai E, Marshall CJ. 2002. ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nature Cell Biol* 4: 408-415.

Sapin C, Baricault L, Trugnan G. 1997. PKC-dependent long-term effect of PMA on protein cell surface expression in Caco-2 cells. *Exp Cell Res* 231: 308-318.

Sawada N, Itoh H, Yamashita J, Doi K, Inoue M, Masatsugu K, Fukunaga Y, Sakaguchi S, Sone M, Yamahara K, Yurugi T, Nakao K. 2001. cGMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates RhoA. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 798-805.

Schoenwaelder SM, Burridge K. 1999. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 11:274-286.

Serres M, Filhol O, Lickert H, Grangeasse C, Chambaz EM, Stappert J, Vincent C, Schmitt D. 2000. The disruption of adherens junctions is associated with decrease of E-cadherin phosphorylation by protein kinase CK2. *Exp Cell Res* 257: 255-264.

Shibamoto S, Hayakawa M, Takeuchi K, Hori T, Oku N, Miyazawa K, Kitamura N, Takeichi M, Ito F. 1994. Tyrosine phosphorylation of beta-catenin and plakoglobin enhanced by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor in human carcinoma cells. *Cell Adhes Commun* 1:295-305.

Somasiri A, Wu C, Ellchuk T, Turley S, Roskelley CD. 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for adherens junction-dependent mammary epithelial cell spheroid formation. *Differentiation* 66:116-125.

Stappert J, Kemler R. 1994. A short core region of E-cadherin is essential for catenin binding and is highly phosphorylated. *Cell Adhes Commun* 2: 319-327.

Takeichi M. 1995. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 7:619-627.

Tsukita S, Oishi K, Akiyama T, Yamanashi Y, Yamamoto T, Tsukita S. 1991. Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. *J Cell Biol* 113:867-879.

Vachon PH, Beaulieu JF. 1992. Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology* 103:414-423.

Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, Fuchs E. 2000. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* 100: 209-219.

## **FIGURE LEGENDS**

### **Figure 1. 8Br-cAMP inhibits differentiation of human intestinal Caco-2/15 epithelial cells.**

**A and B.** Confluent Caco-2/15 cells (day 0) were treated daily with (+) or without (-) 1 mM 8Br-cAMP and harvested at days 3, 6, 9, 12 and 15 post-confluence. Equal amount of lysate proteins were separated by SDS-PAGE and proteins analyzed by Western blotting to determine the expression levels of CREB, phosphorylated CREB (CREB<sup>P</sup>), phosphorylated ATF-1 (ATF-1<sup>P</sup>), sucrase-isomaltase and villin. **C.** Electron micrographs of Caco-2/15 cells treated from days 0 to 14 post-confluence in the presence (panels 2 and 4) or absence (panels 1 and 3) of 1 mM 8Br-cAMP.

### **Figure 2. 8Br-cAMP alters adherens junction integrity in confluent Caco-2/15 cells. A-B.**

Newly confluent Caco-2/15 cells (day 0) were treated with or without 1mM 8Br-cAMP. **A.** After 24 h, cells were fixed for immunofluorescence and stained for  $\alpha$ -catenin,  $\beta$ -catenin, E-cadherin and ZO-1 proteins. Bars = 10 $\mu$ m. **B.** After 72 h of 8Br-cAMP treatment, cells were lysed in Laemmli buffer and total proteins were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting for E-cadherin,  $\alpha$ -catenin,  $\beta$ -catenin and actin.

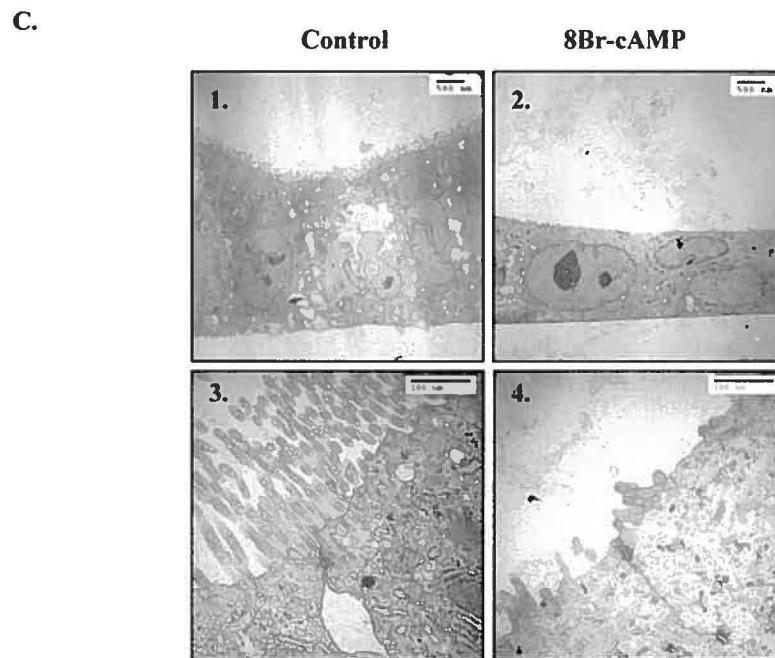
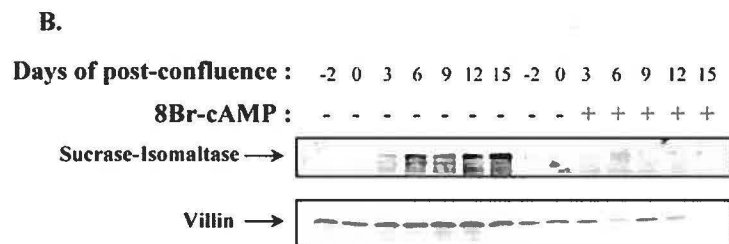
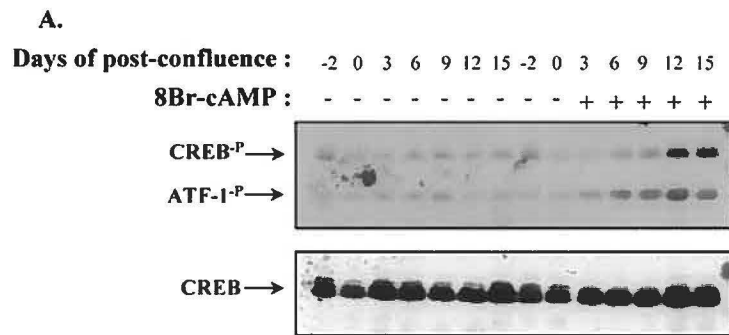
**Figure 3. 8Br-cAMP negatively regulates actin organization and E-cadherin,  $\beta$ -catenin,  $\alpha$ -catenin association with the cytoskeleton.** **A.** Newly confluent Caco-2/15 cells (day 0) were treated with or without 1mM 8Br-cAMP. After 72 h of 8Br-cAMP treatment, cells were lysed in Laemmli buffer or in cytoskeleton stabilizing buffer. Thereafter, cytoskeletal-associated proteins (insoluble) were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting for E-cadherin,  $\alpha$ -

catenin,  $\beta$ -catenin and actin. **B.** Newly confluent Caco-2/15 cells (day 0) were treated with or without 1mM 8Br-cAMP and 10  $\mu$ M H89. After 24 h, cells were fixed for immunofluorescence and stained for E-cadherin and F-actin with fluorescein isothiocyanate-phalloidin. Bars = 10 $\mu$ m.

**Figure 4. Inhibition of PKA activity prevents disruption of adherens junction induced by calcium depletion.** Day 2 post-confluent Caco-2/15 cell monolayers were serum-starved for 16 h and then treated with 4mM EGTA for 30 min with or without 10  $\mu$ M H89. The EGTA-containing medium was replaced with fresh calcium-containing medium supplemented or not with H89 for 30 min. Cells were fixed for immunofluorescence and stained for E-cadherin protein. Bars= 10 $\mu$ m.

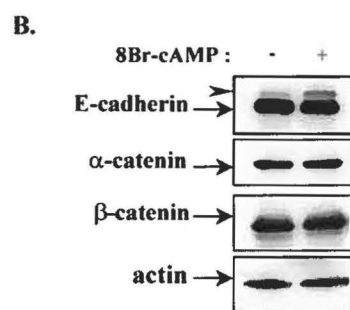
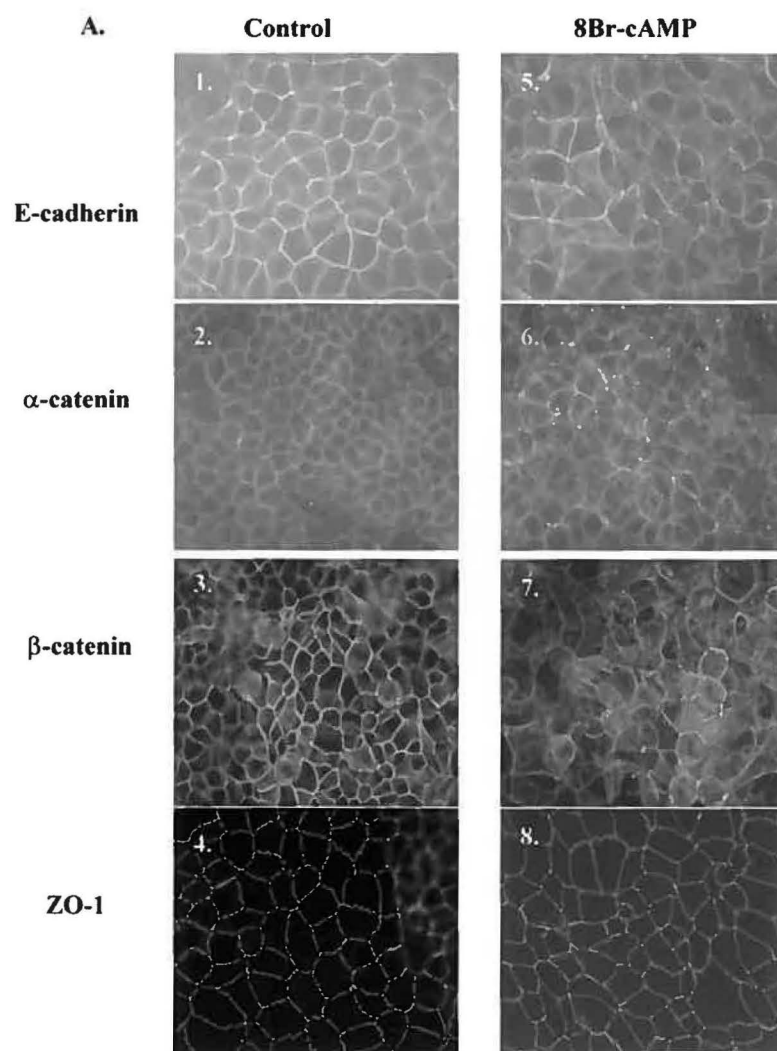
**Figure 5. 8Br-cAMP prevents E-cadherin-induced p85/PI-3K recruitment and activation at cell-cell contact sites.** **A.** Newly confluent Caco-2/15 cells (day 0) were treated with or without 1 mM 8Br-cAMP for 24 h. Cells were fixed for immunofluorescence and co-stained for p85/PI-3K and E-cadherin proteins. Bars= 10 $\mu$ M. **B.** Day 2 post-confluent Caco-2/15 cell monolayers were serum-starved for 16 h and then treated with 4 mM EGTA for 30 min with (+) or without (-) 10  $\mu$ M H89. The EGTA-containing medium was replaced with fresh calcium-containing medium supplemented or not with H89 for 5, 15, 30 and 60 min. Lysate proteins were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting for total AKT and phosphorylated AKT (AKT<sup>P(S473)</sup>). **C.** Newly confluent Caco-2/15 cells (day 0) were daily treated with or without 1 mM 8Br-cAMP for 3 days. Total lysate proteins were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting for total AKT and phosphorylated AKT (AKT<sup>P(S473)</sup>).

**Figure 6. PKA-dependent phosphorylation of E-cadherin.** **A.** Newly confluent Caco-2/15 cells (day 0) were treated daily with (+) or without (-) 1mM 8Br-cAMP for 3 days. Cells were then lysed followed by E-cadherin immunoprecipitation from 600  $\mu$ g of lysate proteins. Immunoprecipitated proteins were solubilized in Laemmli buffer and separated by SDS-PAGE followed by Western blot analysis to determine E-cadherin content. Thereafter, membranes were dehybridized, saturated and re-incubated for Western blot analysis with an antibody specifically recognizing proteins phosphorylated on serine residues localized in the context of positive or neutral amino acids. **B.** Newly confluent Caco-2/15 cells (day 0) were treated with (+) or without (-) 1 mM 8Br-cAMP for 3 days in presence or absence of 10  $\mu$ M H89, 10  $\mu$ M Y27632, 5  $\mu$ M Gö6976. Total lysate proteins were separated by SDS-PAGE and proteins subjected to Western blotting for E-cadherin protein. **C.** Kinase assays were performed by incubating active recombinant PKA, p38 $\alpha$ / $\beta$  or cyclin E/cdk2 complex for 30 min with 5  $\mu$ g of GST-E-cadherin fusion protein as described in Material and Methods. The reaction was stopped by addition of Laemmli buffer and radiolabeled GST-E-cadherin fusion protein was separated on SDS-PAGE and autoradiographed. **D.** Newly confluent Caco-2/15 cells (day 0) were treated daily with (+) or without (-) 1 mM 8Br-cAMP for 3 days. Cells were then lysed followed by  $\beta$ -catenin immunoprecipitation from 600  $\mu$ g of lysate proteins. Immunoprecipitated proteins were solubilized in Laemmli buffer, separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting to determine E-cadherin,  $\alpha$ -catenin and  $\beta$ -catenin content in the immunoprecipitates.

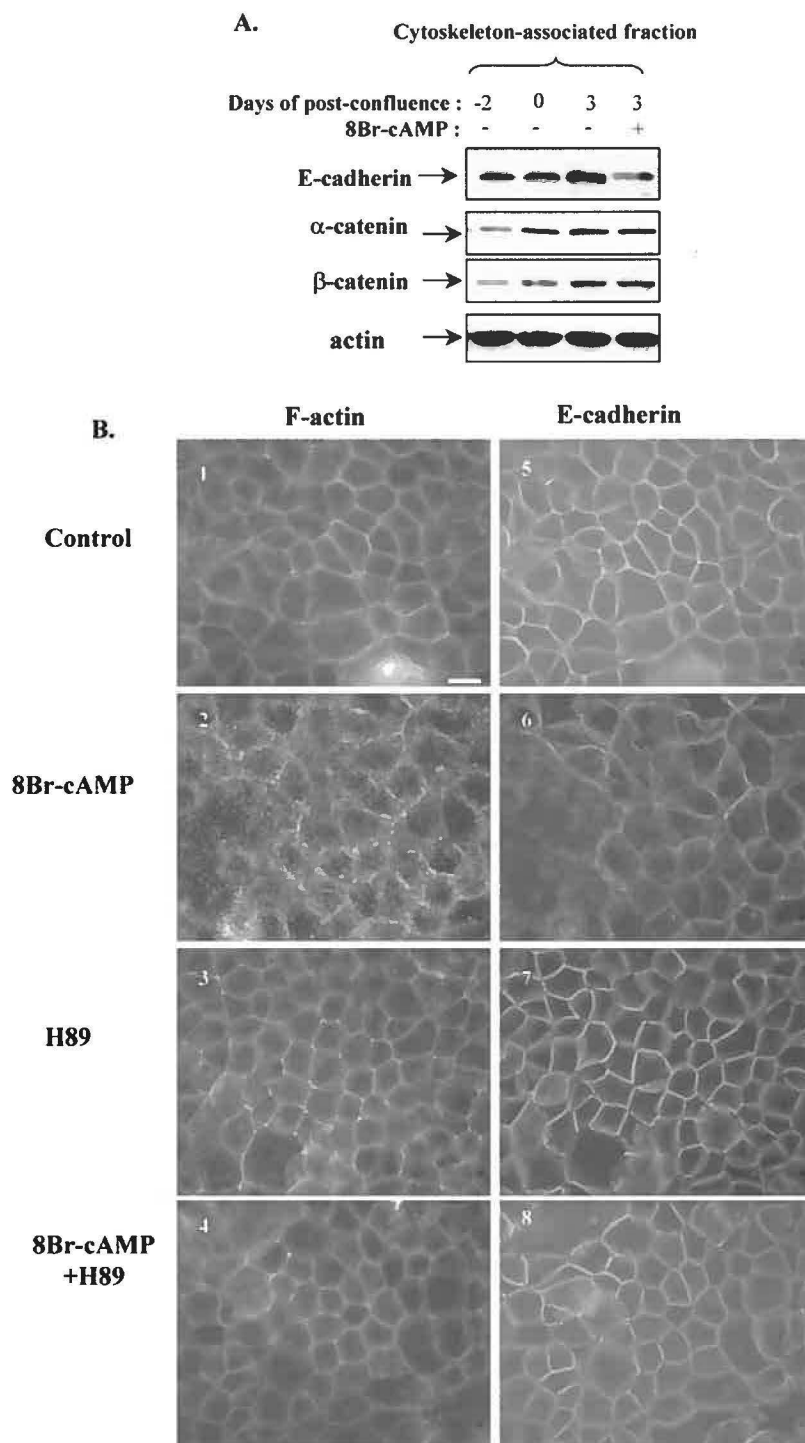


**Figure 1**

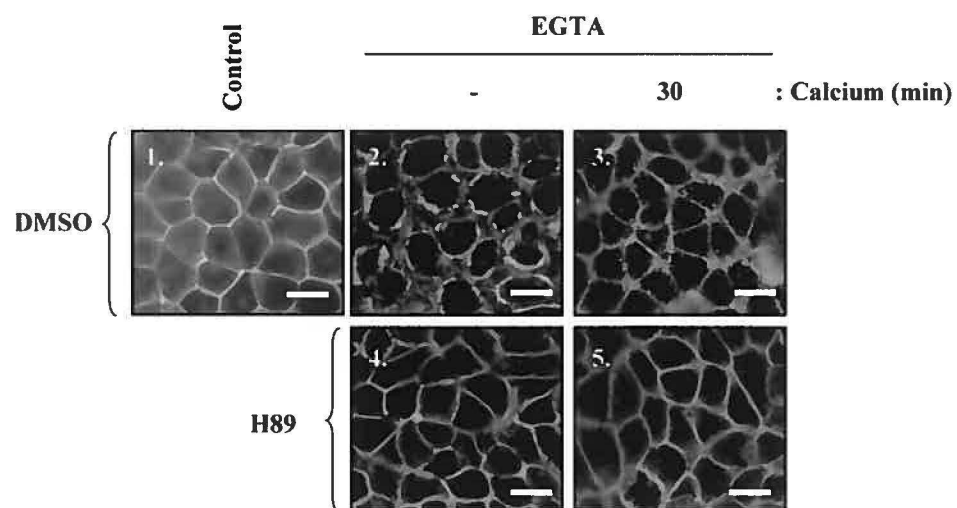




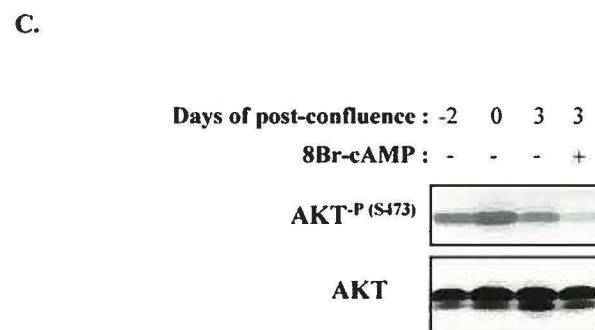
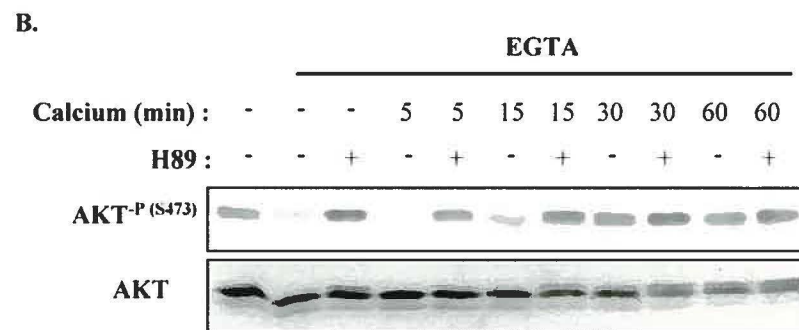
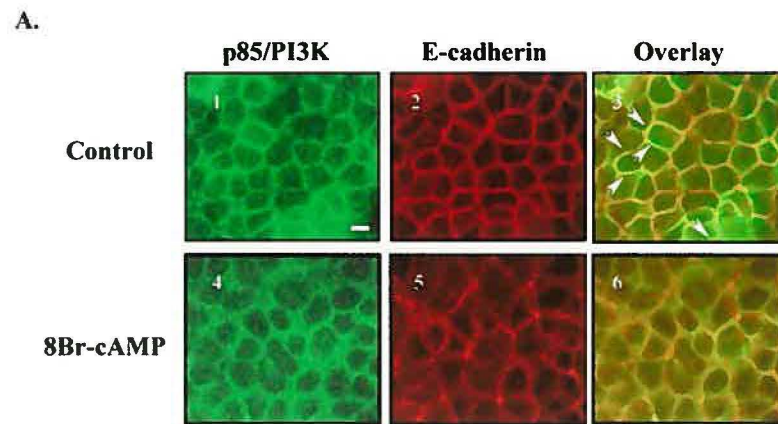
**Figure 2**



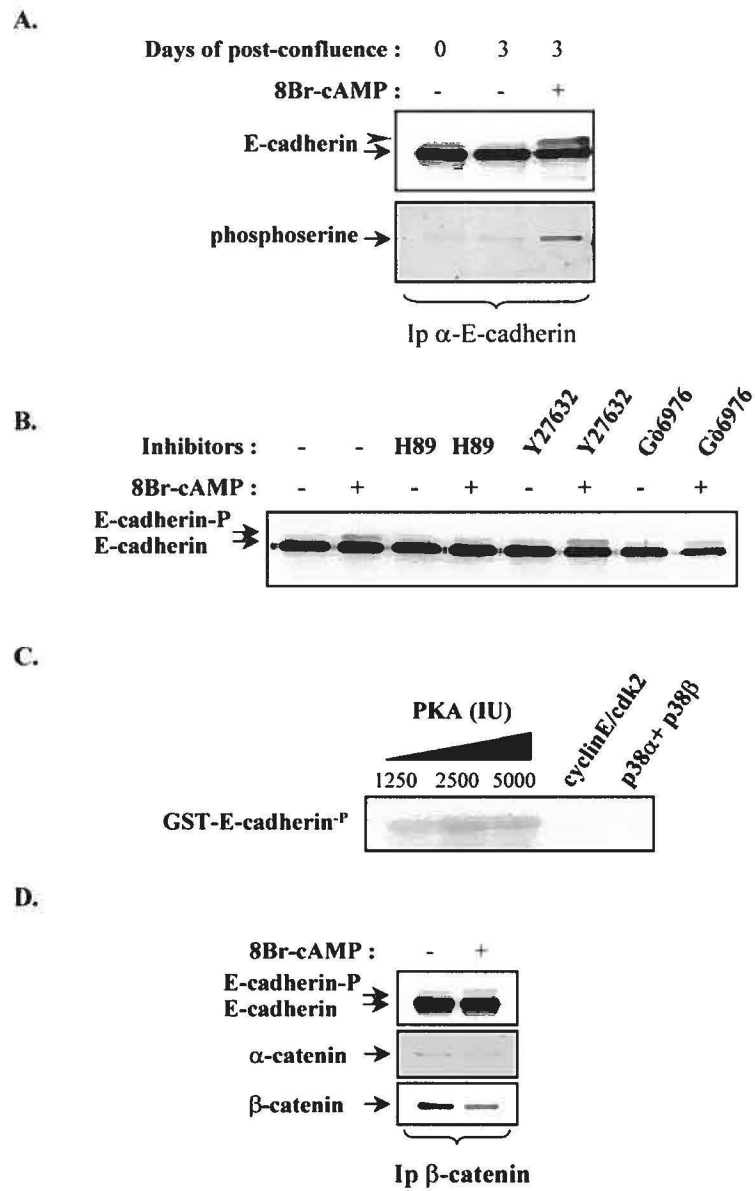
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**

L'inhibition de la PKA par l'inhibiteur H89 a prévenu le démantèlement des jonctions adhérentes induit par la chelation du calcium extracellulaire. 4- Le traitement des Caco-2/15 avec le 8Br-cAMP a prévenu le recrutement de la p85/PI3K à la membrane à proximité de la E-cadhérine, une étape importante pour la différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines. 5- La E-cadhérine pourrait être phosphorylée sur résidu sérine *in vivo* par un mécanisme dépendant de la PKA. CONCLUSION. Nos résultats suggèrent que la cascade AMPc/PKA peut influencer négativement l'intégrité des jonctions adhérentes et la différenciation morphologique et fonctionnelle des cellules épithéliales intestinales.

## CHAPITRE III

### DISCUSSION

#### **1. LA CASCADE MEK/ERK EST NÉCESSAIRE MAIS NON SUFFISANTE À LA PROLIFÉRATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES CRYPTALES INTESTINALES.**

Dans un premier temps, nous avons tenté de répondre à la question : est-ce qu'une activation soutenue de la cascade MEK/ERK est suffisante à la progression en phase G1 et à l'entrée en phase S des cellules épithéliales cryptales intestinales? Pour ce faire, nous avons procédé à l'établissement de cultures cellulaires cryptales intestinales exprimant de façon stable une forme constitutive active de MEK1. Les cultures cellulaires utilisées étaient les cellules HIEC et les cellules IEC-6. Les cellules HIEC ont été isolées à partir de l'épithélium intestinal de fœtus humain (Perreault et Beaulieu, 1996). Ce sont des cellules normales non-immortalisées ayant la propriété de proliférer à sous-confluence et de bloquer leur prolifération à l'atteinte de la confluence (Deschênes et al., 2001), mais n'entament jamais de programme de différenciation entérocytaire. Les cellules HIEC représentent donc un bon modèle cellulaire pour étudier les mécanismes normaux régularisant la prolifération des cellules normales cryptales intestinales. Quant aux IEC-6, il s'agit d'une lignée cellulaire établie à partir de cellules isolées de l'épithélium intestinal de rat (Quaroni et al., 1979). Tout comme les cellules HIEC, ce sont

des cellules prolifératives à sous-confluence, qui bloquent leur prolifération à l'atteinte de la confluence et qui n'entament jamais de processus de différenciation. Cependant, contrairement aux HIEC, les IEC-6 sont des cellules immortalisées ce qui en fait donc une lignée cellulaire. Par contre, elles présentent les caractéristiques de cellules épithéliales normales (Quaroni et al., 1979), ce qui en fait une lignée cellulaire utile pour l'étude des mécanismes intracellulaires influençant la prolifération des cellules cryptales intestinales.

Dans le but d'activer de façon soutenue la cascade MEK/ERK, nous avons procédé à une infection rétrovirale des cultures cellulaires HIEC et IEC-6 avec une forme constitutive active de MEK1 (MEK CA). Cette forme constitutive active résulte de la mutation des sérines 118 et 222 de MEK1 en acides aspartiques mimant ainsi la charge négative normalement amenée par la phosphorylation de ces sérines par la kinase Raf-1 (Brunet et al., 1994). Cette MEK CA a été utilisée d'une part parce que, jusqu'à présent, il n'existe pas de forme constitutive active des ERK. En effet, le remplacement de la thréonine et de la tyrosine phosphorylées par MEK par des acides aminés n'augmente pas l'activité catalytique des ERK (Zhang et al., 1995). D'autre part, jusqu'à preuve du contraire, les seuls substrats connus de MEK1 sont les ERK1 et ERK2 (Pearson et al., 2001).



### **1.1. UNE ACTIVATION FORTE ET SOUTENUE DE LA CASCADE MEK/ERK ENTRAÎNE LA SÉNESCENCE DES CELLULES ÉPITHÉLIALES CRYPTALES INTESTINALES HUMAINES HIEC**

Les résultats obtenus nous ont permis de démontrer que l'activation soutenue de MEK1 peut mener à deux réponses cellulaires bien distinctes dans les cellules épithéliales cryptales intestinales. D'abord, dans les cellules épithéliales normales non-immortalisées isolées de cryptes intestinales humaines, les cellules HIEC, l'expression d'une MEK CA bloque complètement la prolifération cellulaire visualisée par l'absence d'une augmentation dans le nombre de cellules 5 jours après l'ensemencement (Papier 1, Figure 2A). Au contraire, les cellules HIEC infectées avec un vecteur vide, pLXIN, ou une version sauvage de MEK, MEK WT, doublent leur population cellulaire en l'espace de ces 5 jours (Papier 1, Figure 2A). Cet arrêt de prolifération est confirmé 1- par la perte de la capacité des cellules HIEC-MEK CA privées en sérum d'induire l'hyperphosphorylation de pRb suite à une stimulation mitogénique (Papier 1, Figure 2B) et 2- par l'inhibition de 50% de l'activité du gène rapporteur thymidine-kinase luciférase, un gène rapporteur marquant l'entrée en phase S des cellules (DeGregori et al., 1995), dans les cellules HIEC exprimant transitoirement une MEK CA (Papier 1, Figure 2C). Il est à noter que malgré l'arrêt de prolifération, nous n'avons détecté aucun signe de mort cellulaire dans les cellules HIEC-MEK CA : pas de détachement cellulaire même après un mois de culture, pas de

bourgeonnement membranaire et pas de condensation de l'ADN. De plus, puisque les cellules HIEC-MEK CA ne prolifèrent plus, nous pouvons penser que s'il y avait eu mort cellulaire, nous aurions compté beaucoup moins de cellules 5 jours après leur ensemencement (Papier 1, Figure 2A). Pris ensemble, ces résultats indiquent que l'activation soutenue de MEK1 inhibe la prolifération des cellules HIEC en bloquant de façon permanente les cellules en phase G1 du cycle cellulaire.

L'arrêt permanent en phase G1 du cycle cellulaire et la morphologie des cellules HIEC-MEK CA, cytoplasme large et aplati, rapportée comme caractéristique des cellules sénescences (Stein et Dulic, 1995), nous ont par la suite amené à vérifier le développement d'une activité  $\beta$ -galactosidase fonctionnant à pH 6.0, un marqueur de cellules sénescences (Dimri et al., 1995). La détection d'une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (Papier 1, Figure 3) nous permet d'affirmer que l'activation soutenue de MEK1 dans les cellules normales cryptales intestinales HIEC provoque la sénescence de ces cellules. Par définition, l'état classique de sénescence représente un phénotype dans lequel les cellules sont arrêtées de façon permanente en phase G1 du cycle cellulaire mais où les cellules demeurent métaboliquement actives et viables (Gire et Wynford-Thomas, 1999). Il existe deux types de sénescence. Le processus de *sénescence répllicative* est conditionné par l'érosion progressive des extrémités spécialisées du chromosome, les télomères, qui constituent une horloge mitotique. Au cours des dernières années, plusieurs groupes ont mis en évidence la *sénescence*

*prématurée* déclenchée par l'activation inappropriée de la voie de signalisation Ras/Raf/MEK (Lin et al., 1998; Serrano et al., 1997; Zhu et al., 1998) ou suite à des dommages à l'ADN (Di Leonardo et al., 1994; Robles et Adami, 1998). La sénescence prématurée n'implique pas le raccourcissement des télomères (Suzuki et al., 2001) et n'est pas prévenue par la ré-expression d'une télomérase (Morales et al., 1999). Il a été suggéré que la sénescence prématurée pourrait constituer un mécanisme physiologique de défense contre le début de la tumorigenèse (DePinho, 2000; Weinberg, 1997). Ainsi, on peut qualifier de sénescence prématurée le phénotype induit par l'activation soutenue de MEK1 dans les cellules HIEC.

Nous avons également observé dans les cellules HIEC-MEK CA, une augmentation significative de l'expression de p53, p21 et p16<sup>INK4A</sup> (Papier 1, Figure 6A). La forte expression de ces protéines constitue une caractéristique à la fois de la sénescence répllicative (Atadja et al., 1995; Bond et al., 1996; McConnell et al., 1998; Reznikoff et al., 1996; Zindy et al., 1997) et de la sénescence prématurée due à l'activation soutenue de la cascade Ras/Raf/MEK (Lin et al., 1998; Serrano et al., 1997; Zhu et al., 1998). Ainsi, nos résultats dans les cellules épithéliales intestinales humaines sont en parfait accord avec ceux obtenus dans les fibroblastes humains normaux non-immortalisés. La contribution de chacune des protéines dans l'arrêt de la prolifération et l'induction de la sénescence demeure toutefois à être élucidée. Il a été rapporté que la microinjection d'anticorps p53 neutralisant dans les fibroblastes humains âgés (sénescence répllicative) suffisait à elle seule à re-

stimuler la synthèse d'ADN et à induire la division cellulaire (Gire et Wynford-Thomas, 1998). Toujours dans les fibroblastes humains, une autre étude a révélé que la surexpression soutenue de p16<sup>INK4A</sup> pouvait bloquer la prolifération cellulaire, induire la sénescence et ainsi mimer tous les effets amenés par l'expression d'une forme oncogénique de Raf (Zhu et al., 1998). De par nos résultats avec les cellules épithéliales intestinales, nous ne pouvons attribuer le rôle d'arrêt de prolifération et d'induction de la sénescence à un candidat (p53, p21, p16<sup>INK4A</sup>) particulier. Il pourrait donc être intéressant d'évaluer si la non-expression de l'une ou plusieurs de ces protéines est nécessaire pour contrecarrer la sénescence induite par la MEK CA dans les cellules HIEC. Il est assez bien documenté jusqu'à présent qu'une inactivation des voies pRb/p16<sup>INK4A</sup> et p53 est nécessaire pour échapper à la sénescence dans les cellules humaines (Shay et al., 1991a; Shay et al., 1991b; Wright et Shay, 1992) alors que dans les cellules de rongeur, l'inactivation d'une seule de ces voies est suffisante pour bloquer la sénescence (Kamijo et al., 1997; Harvey et al., 1993; Harvey et Levine; 1991). Il a été suggéré que c'est pour cela que les cellules de rongeurs sont plus faciles à immortaliser que les cellules humaines (Serrano et al., 1997). Dans les cellules de cancer de colon humain HCT 116 p21<sup>-/-</sup>, et non dans la lignée parentale HCT 116, une étude a montré une absence d'induction de sénescence suite au traitement des cellules avec de faibles doses de camptothécine, une drogue causant des dommages à l'ADN, suggérant dans

ce cas une contribution de p21 dans l'état sénescence de cellules épithéliales intestinales (Han et al., 2002).

Des études complémentaires, non-présentées dans les articles publiés dans le cadre de mon doctorat, nous ont permis d'appuyer le rôle de p21 dans l'arrêt de la prolifération induit par l'activation soutenue de la cascade MEK/ERK dans les cellules épithéliales cryptales intestinales humaines (voir Complément 1, Figures 1,2). En effet, dans l'optique de répondre à la question initiale à savoir si une activation soutenue de la cascade MEK/ERK est suffisante à la prolifération des cellules épithéliales cryptales intestinales, nous avons fait quelques expériences en utilisant le phorbol ester PMA. Le PMA est reconnu comme un puissant stimulateur de l'activité des ERK (Sutor et al., 1999) et souvent utilisé pour stimuler la cascade MEK/ERK et ainsi étudier plus spécifiquement les effets de l'activation de cette cascade. Son mécanisme d'action réside en l'activation des PKC qui, elles, peuvent activer la cascade Ras/Raf/MEK/ERK à différent niveau : soit au niveau de Ras, Raf ou MEK. Comme présenté dans le Complément 1, le traitement des cellules HIEC avec le PMA amène une activation soutenue des ERK pendant au moins 4h, activité qui revient au niveau de base 16h après l'ajout de PMA (Figure 1). Il est documenté que le traitement chronique des cellules avec le PMA conduit à une dégradation des PKC qui ne peuvent alors plus assurer leur signalisation (Young et al., 1987). Ainsi, cela peut facilement expliquer la perte d'activation des ERK par le PMA après 16h de traitement. La cinétique d'activation des ERK par le PMA diffère de celle amenée par le sérum (FBS

5%) où une activité supérieure des ERK est retrouvée 16h après la stimulation des cellules avec le sérum par rapport aux cellules non-stimulées (Complément 1, Figure 1). Comme on peut le constater, seul le traitement avec le sérum est interprété comme un signal mitogénique par la cellule puisque l'hyperphosphorylation de pRb n'est détectée que dans les cellules stimulées avec le sérum. Cela suggère que l'activation soutenue de la cascade MEK/ERK pendant au moins 4h n'est pas suffisante pour permettre aux cellules épithéliales intestinales humaines d'atteindre le point de restriction et d'entrer dans la phase S du cycle cellulaire. Le traitement des cellules avec le PMA permet tout de même une certaine progression dans la phase G1 du cycle cellulaire puisqu'il parvient à augmenter l'expression de la cycline D1. Cependant, la forte expression de p21 induite par le PMA suggère un rôle de cet inhibiteur dans la non-atteinte du point de restriction. Pour confirmer cela, nous avons fait une autre expérience en ajoutant le PMA ou l'inhibiteur de MEK, U0126, pendant les 6 dernières heures d'une stimulation au sérum (16h). Les buts de cette expérience étaient 1- de vérifier l'effet d'une forte activité soutenue de la cascade MEK/ERK pendant 16h sur la progression du cycle cellulaire des cellules épithéliales intestinales, 2- de confirmer le rôle de la cascade MEK/ERK dans l'effet du PMA et 3- d'attribuer un rôle à l'inhibiteur p21 dans la non-progression du cycle cellulaire jusqu'au point de restriction dans les cellules présentant une forte activité soutenue de la cascade MEK/ERK. La figure 2 présentée dans le Complément 1 montre que le traitement des cellules au PMA pendant les 6 dernières heures d'une

stimulation au sérum 1- maintient une forte activité de la cascade MEK/ERK, 2- augmente de façon significative l'expression de p21 et 3- bloque l'hyperphosphorylation de pRb normalement amenée par le sérum. Les résultats obtenus avec l'utilisation du U0126 nous indiquent quant à eux que 1- l'inhibition de l'activité de la cascade MEK/ERK dans les 6 dernières heures d'une stimulation au sérum n'influence pas la progression des cellules jusqu'au point de restriction (hyperphosphorylation de pRb), 2- l'inhibition de la forte activité de la cascade MEK/ERK, due au traitement combiné du sérum et du PMA, bloque l'induction de l'expression de p21 amenée par le PMA et relève l'effet inhibiteur du PMA sur la progression du cycle cellulaire jusqu'au point de restriction.

Pris dans leur ensemble, les résultats présentés dans le Complément 1 suggèrent fortement que l'activation soutenue de la cascade MEK/ERK pendant au moins 4h (Complément 1, Figure 1.) dans les cellules épithéliales intestinales ne suffit pas à la progression des cellules jusqu'au point de restriction et à l'entrée en phase S du cycle cellulaire. L'inhibiteur p21 pourrait être le grand responsable. De plus, ces résultats suggèrent qu'une forte activité soutenue de la cascade MEK/ERK pendant 16h (issue de la stimulation des cellules par le sérum pendant 16h et où du PMA a été ajouté entre les 10<sup>e</sup> et 16<sup>e</sup> h) ne permet pas l'atteinte du point de restriction due à la forte augmentation de l'expression de p21. Des résultats similaires ont déjà été obtenus dans les fibroblastes d'embryon de souris, les NIH 3T3, où une forte activité soutenue de Raf induit une forte augmentation de l'expression de

p21 et conséquemment conduit à un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire (Sewing et al., 1997; Woods et al., 1997).

Une récapitulation des travaux effectués dans le laboratoire du Dr Rivard nous permet de dessiner un portrait sur l'implication de la cascade MEK/ERK dans la prolifération des cellules épithéliales cryptales intestinales.

1- Une activation précoce et soutenue de la cascade MEK/ERK est essentielle à la progression en phase G1 et à l'entrée en phase S du cycle cellulaire puisque l'ajout simultané du PD98059, un inhibiteur de MEK, avec le sérum bloque l'action mitogénique du sérum ou de l'EGF (Aliaga et al., 1999; Rivard et al., 1999). 2- Une ou des voies de signalisation complémentaires activées par les agents mitogéniques doivent être impliquées pour régulariser l'expression de l'inhibiteur p21 qui est fortement induit par la cascade MEK/ERK. Une candidate potentielle qui serait intéressante à étudier est la cascade en aval de Rho. La cascade en aval de Rho peut contrôler négativement la forte expression de p21 induite par la cascade MEK/ERK et ainsi permettre la prolifération cellulaire à la suite d'une stimulation mitogénique (Danen et al., 2000; Olson et al., 1998). De plus, la cascade en aval de Rho peut assurer une expression adéquate dans le temps de la cycline D1 (Welsh et al., 2001). Il s'agirait donc d'une voie potentielle responsable de la régulation de l'expression appropriée dans le temps de la cycline D1 suite à une stimulation mitogénique dans les cellules épithéliales intestinales puisque la seule activation de la cascade MEK/ERK par le PMA permet une augmentation de l'expression de la cycline D1 mais de façon très



précoce par rapport à l'augmentation de l'expression de la cycline D1 induite par le sérum (voir Complément 1, Figure 1). 3- Une diminution de l'activité de la cascade MEK/ERK à la fin de la phase G1 est nécessaire à la progression de la phase G1 jusqu'au point de restriction puisque le maintien d'une forte activité de la cascade MEK/ERK, par le PMA, bloque la progression de la phase G1 du cycle cellulaire (Complément 1, Figure 2). 4- Le niveau d'activité de la cascade MEK/ERK atteint suite à la diminution de l'activité de cette cascade à la fin de la phase G1 ne semble pas important puisque la réduction encore plus importante de la cascade MEK/ERK, par le U0126, à la fin de la phase G1 n'empêche pas le passage du point de restriction.

Dans l'avenir, il serait très intéressant de corrélérer nos observations dans les cellules HIEC avec ce qu'on observe dans les cellules de l'épithélium intestinal *in vivo*. Tout d'abord, les études du Dr Rivard ont montré qu'il y avait une forte expression de p21 dans le noyau de certaines cellules de la crypte. Ils ont par la suite confirmé que ces cellules fortement marquées par p21 étaient des cellules non-prolifératives (Deschênes et al., 2001). Nos résultats avec le PMA appuie effectivement un rôle pour p21 dans l'arrêt de prolifération des cellules épithéliales intestinales. De plus, nos résultats préliminaires avec le PMA suggèrent que l'augmentation de p21 n'est pas accompagnée d'une augmentation de l'expression de p53 et de p16<sup>INK4A</sup> (résultats non montrés). Ainsi, on pourrait penser que la présence de la MEK CA dans les cellules HIEC amène d'abord une augmentation d'expression de p21 qui bloque la prolifération des cellules épithéliales intestinales. Il serait

intéressant de voir si une sur-expression prolongée de p21 peut conduire à une induction de l'expression de p53 et p16<sup>INK4A</sup> puis à un phénotype sénescence. Il est à noter que l'expression d'une protéine p21 inductible dans les cellules NIH 3T3 bloque les cellules en phase G1 du cycle cellulaire et induit un phénotype similaire à la sénescence (Chen et al., 2002). On pourrait également se demander si les cellules de la villosité de l'épithélium intestinal sont des cellules sénescence. En effet, les cellules sénescence et les cellules peuplant la villosité de l'épithélium intestinal présentent plusieurs points en commun : 1- les cellules sont arrêtées de façon permanente en phase G1 du cycle cellulaire, 2- les cellules sont métaboliquement actives et viables, 3- et on note une forte expression protéique de p16<sup>INK4A</sup>. Effectivement, le noyau des cellules de la villosité est plus fortement marqué par un anticorps anti-p16<sup>INK4A</sup> que les cellules de la crypte (Annexe 2, Figure 1). Ainsi, on pourrait supposer que la forte expression de p21 dans certaines cellules de la crypte de l'épithélium intestinal permet l'arrêt du cycle cellulaire de ces cellules qui, suite à l'arrêt permanent de leur prolifération, adopte un phénotype sénescence lorsqu'elles arrivent dans le compartiment villositaire de l'épithélium intestinal.

## **1.2. UNE ACTIVATION FORTE ET SOUTENUE DE LA CASCADE MEK/ERK INDUIT LA TRANSFORMATION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES CRYPTALES INTESTINALES DE RAT IEC-6**

Dans les cellules épithéliales cryptales intestinales de rat IEC-6, l'expression d'une MEK CA conduit à une réponse cellulaire tout à fait différente de celle observée dans les cellules HIEC. En effet, l'activation soutenue de MEK1 constitue un avantage prolifératif pour les cellules IEC-6. Au départ, sans noter de différence dans la vitesse de prolifération des cellules IEC-6-MEK CA sous-confluentes lorsque cultivées en présence de 5% sérum, il a été facile d'observer une perte d'arrêt de prolifération des cellules IEC-6-MEK CA après l'atteinte de la confluence. Alors que les cellules IEC-6-pLXIN et IEC-6-MEK WT arrêtent leur prolifération après l'atteinte de la confluence, les IEC-6-MEK CA 1- continuent de proliférer (Papier 1, Figure 2D) et 2- présentent une forme hyperphosphorylée de pRb plusieurs jours après l'atteinte de la confluence (Papier 1, Figure 2E). Visuellement, cette perte d'arrêt de prolifération après l'atteinte de la confluence se manifeste par la présence de régions très denses en cellules (microscopie à contraste de phase) (Papier 1, Figure 4A) qui s'avèrent être des empilements de cellules les unes par-dessus les autres (microscopie électronique) (Papier 1, Figure 4B). Ces résultats suggèrent qu'il y a une perte d'inhibition de contact dans les cellules IEC-6-MEK CA, une caractéristique de cellules transformées. Pour confirmer l'état transformé des cellules IEC-6-MEK CA, nous avons évalué deux autres caractéristiques des

cellules transformées : la perte de la dépendance d'ancrage et la diminution de la dépendance en agents mitogènes pour la prolifération. Contrairement aux cellules IEC-6-MEK WT, les cellules IEC-6-MEK CA réussissent à former des colonies suite à leur ensemencement en agar mou (Papier 1, Figure 4C). De plus, grâce à des expériences de réinitiation de synthèse d'ADN, nous avons noté qu'une certaine proportion des cellules IEC-6-MEK CA sont aptes à entrer en phase S du cycle cellulaire même en présence d'aussi peu que 0.1% sérum ou même en absence totale de sérum (Papier 1, Figure 2F). Ainsi, ces résultats suggèrent fortement que l'expression d'une MEK CA initie une transformation des cellules épithéliales intestinales normales immortalisées de rat IEC-6.

Contrairement aux cellules HIEC-MEK CA, nous n'avons détecté aucune modulation dans l'expression des protéines p53 et p21 dans les cellules IEC-6-MEK CA. Quant à la protéine p16<sup>INK4A</sup>, il nous a été impossible, à l'aide de deux anticorps différents, de détecter sa présence, en immunobuvardage ou en immunofluorescence et ce, dans toutes les lignées IEC-6 (parentale, pLXIN, MEK WT et MEK CA). À prime abord, cela pourrait supposer de mauvaises conditions expérimentales ne favorisant pas la détection de p16<sup>INK4A</sup> dans les cellules de rat IEC-6. Cependant, nous avons effectué une immunofluorescence dans l'épithélium intestinal de rat et nous avons été en mesure de facilement détecter p16<sup>INK4A</sup> dans le noyau des cellules de l'épithélium intestinal de rat. Ainsi, ces résultats suggèrent que les cellules IEC-6 n'expriment pas la protéine p16<sup>INK4A</sup>. Le statut du gène de

p16<sup>INK4A</sup> demeure toutefois à être confirmé dans nos cellules IEC-6. Il est fort intéressant de noter qu'il a précédemment été rapporté qu'une méthylation du promoteur de p16<sup>INK4A</sup> contribuait à l'inactivation de ce gène dans les cellules épithéliales intestinales immortalisées de rat IEC-18, une lignée cellulaire s'apparentant aux IEC-6 (Guan et al., 1999). Ainsi, la méthylation du promoteur du gène de p16<sup>INK4A</sup> pourrait expliquer la non-expression de la protéine p16<sup>INK4A</sup> dans les cellules IEC-6.

Il est maintenant connu que des mutations dans les gènes de p53 et/ou p16<sup>INK4A</sup> surviennent spontanément durant l'établissement de lignées cellulaires immortalisées (Harvey et Levine, 1991; Huschtscha, et Reddel, 1999; Reznikoff et al., 1996; Rogan et al., 1996). Comme les IEC-6 constituent une lignée cellulaire immortalisée, il est fort probable qu'une mutation dans l'un et/ou l'autre de ces gènes existe. Selon une récente publication, les cellules IEC-6 utilisées par Moucadel et al. (2002) expriment une forme de type sauvage de p53. Dans notre cas, l'anticorps de p53 utilisé est capable de reconnaître la forme sauvage et les formes mutées de p53. Nous ne pouvons donc pas confirmer le statut de p53 dans la lignée cellulaire IEC-6 que nous avons utilisée dans le cadre de nos expériences. L'absence d'une augmentation de l'expression de p53 dans les cellules IEC-6-MEK CA (Papier 1, Figure 6A), alors que cette même MEK CA réussissait à augmenter l'expression de p53 dans d'autres cellules épithéliales cryptales intestinales (HIEC) (Papier 1, Figure 6A), pourrait suggérer une mutation de p53 dans les IEC-6 rendant p53 insensible à certains stimuli. Par contre, dans le cas où

p53 ne serait pas mutée dans nos cellules IEC-6, il pourrait également y avoir une autre hypothèse au manque de modulation de l'expression de p53 suite à l'expression d'une MEK CA. Dans les cellules normales, l'expression de p53 est maintenue à un niveau relativement faible due à sa dégradation rapide dans le protéasome. Suite à des dommages à l'ADN ou à un stress oncogénique, des mécanismes post-transcriptionnels amènent l'accumulation rapide de la protéine p53 (Levine, 1997). La protéine p19<sup>INK4A/ARF</sup>, issue d'un des deux gènes suppresseurs de tumeurs codé par le locus INK4A avec p16<sup>INK4A</sup>, active p53 en neutralisant MDM2, qui normalement déstabilise p53, et peut également lier directement p53 (Kamijo et al., 1998; Pomerantz et al., 1998; Zhang et al., 1998). Il a été rapporté dans les fibroblastes d'embryon de souris que l'infection rétrovirale avec une forme oncogénique de Ras augmentait l'expression de l'ARNm (Palmero et al., 1998) et de la protéine p19<sup>INK4A/ARF</sup> (Groth et al., 2000) qui était par la suite nécessaire à la stabilisation de p53 (Palmero et al., 1998). En effet, les fibroblastes d'embryon de souris p19<sup>INK4A/ARF</sup><sup>-/-</sup> infectés avec un Ras oncogénique non seulement ne présentent plus d'augmentation d'expression de p53 mais leur vitesse de prolifération est plus rapide par rapport aux cellules non-infectées (Palmero et al., 1998). Dans nos cellules IEC-6, notre incapacité à détecter la protéine p16<sup>INK4A</sup> suggère peut-être une mutation spontanée de p16<sup>INK4A</sup> survenue lors de l'établissement de la lignée cellulaire (Harvey et Levine, 1991; Reznikoff et al., 1996; Rogan et al., 1996) qui pourrait également avoir affectée p19<sup>INK4A/ARF</sup>, un transcrit issu du même gène que p16<sup>INK4A</sup>. Pour

appuyer cela, mentionnons qu'une analyse génétique a démontré que pratiquement toutes les tumeurs présentant une perte d'expression de p19<sup>INK4A/ARF</sup> montrent également une co-délétion de p16<sup>INK4A</sup> (Sharpless et DePinho, 1999). Dans le sens inverse, 64% des tumeurs issues de cancers du poumon à petites cellules présentent à la fois une inactivation de p16<sup>INK4A</sup> et de p19<sup>INK4A/ARF</sup> (Sanchez-Cespedes et al., 1999). De plus, une méthylation du promoteur de p19<sup>INK4A/ARF</sup> a été détectée dans plusieurs lignées cellulaires colo-rectales (Esteller et al., 2000), ce qui pourrait également contribuer à la non-expression de p19<sup>INK4A/ARF</sup> dans les cellules IEC-6. Ainsi, l'absence d'augmentation de l'expression de p53 dans nos cellules IEC-6 infectées avec une MEK CA pourrait provenir de la perte d'expression de p19<sup>INK4A/ARF</sup> qui ne peut plus amener la stabilisation et l'activation de p53. Par le fait même, p53 ne peut transcrire ses gènes cibles comme p21 (El-Deiry et al., 1993) et favoriser l'arrêt de la prolifération cellulaire. Il serait donc intéressant de confirmer le statut de p53 et de p19<sup>INK4A/ARF</sup> dans nos cellules IEC-6 et d'évaluer la contribution de p19<sup>INK4A/ARF</sup> dans la régulation de l'expression de p53. De plus, il serait intéressant d'étudier les mécanismes qui permettent l'augmentation d'expression de p53 dans les cellules HIEC-MEK CA : impliquent-ils des mécanismes dépendants de p14<sup>INK4A/ARF</sup>, l'homologue chez l'humain de p19<sup>INK4A/ARF</sup>?

Il est connu depuis bien longtemps qu'une forme oncogénique de Ras transforme efficacement les lignées cellulaires immortalisées de rongeur (Newbold et Overell, 1983). Il est également connu qu'un Ras oncogénique

doit coopérer avec d'autres altérations oncogéniques pour initier la transformation des cellules (Land et al., 1983; Ruley, 1990). Entre autres, les fibroblastes de souris déficients en p53 ou p16<sup>INK4A</sup> se transforment sous la pression d'une forme oncogénique de Ras (Tanaka et al., 1994; Serrano et al., 1996). Ainsi, si les cellules IEC-6 présentent effectivement une mutation/délétion dans le locus INK4A, il n'est donc pas surprenant qu'elles soient transformées suite à l'expression d'un Ras oncogénique (Boudreau et al., 1999). L'originalité de nos résultats provient du fait que l'expression d'une forme constitutive active de MEK1 est suffisante à induire un phénotype transformé dans les cellules épithéliales intestinales IEC-6. Il avait été auparavant démontré qu'à la fois l'activation de la cascade MEK/ERK et de la PI3K étaient nécessaires à la transformation induite par un mutant de Ras dans des cellules d'origine épithéliale (Gire et al., 1999; Gire et al., 2000). Dans les cellules épithéliales intestinales de rat, RIE-1, il avait été rapporté que l'expression d'une forme constitutive active de Raf-1 ne suffisait pas à transformer les cellules (Oldham et al., 1996). Une autre étude a cependant déjà montré que l'expression d'une MEK1 constitutive active promeut la transformation des fibroblastes NIH3T3 (Greulich et Erickson, 1998). Le bagage génétique des différents types cellulaires doit donc être important pour expliquer les différentes réponses cellulaires suite à l'expression d'un mutant constitutif actif de l'un des effecteurs de la cascade MEK/ERK.

L'avantage prolifératif proféré par la MEK CA dans les cellules IEC-6 se note surtout quelques jours après l'atteinte de la confluence : dissociation



de la courbe de prolifération des cellules IEC-6-MEK CA 15 jours après l'ensemencement (10 jours post-confluence) (Papier 1, Figure 2D) et détection d'une forme hyperphosphorylée de pRb dans les cellules IEC-6-MEK CA post-confluentes (Papier 1, Figure 2E). Pour expliquer cette prolifération des cellules à post-confluence, nous avons évalué l'expression de protéines du cycle cellulaire pouvant influencer le niveau de phosphorylation de pRb. Nous avons effectivement décelé des augmentations significatives de la cycline D1, de cdk4 et de cdk2 (Papier 1, Figure 6B). De plus, nous avons noté une nette diminution de l'expression de p27 dans les IEC-6-MEK CA confluentes par rapport aux cellules IEC-6-MEK WT (Papier 1, Figure 6B). Il est intéressant de noter que des modulations à la hausse de l'expression de la cycline D1, de cdk4 et cdk2 et une réduction de l'expression de p27 ont été associées à la forte capacité proliférative des cellules de cancer colo-rectal (Loda et al., 1997; Palmqvist et al., 1998; Sahl et al., 1999; Thomas et al., 1998; Zhang et al., 1997b). De plus, nous avons préalablement montré que la cascade MEK/ERK était nécessaire à la diminution d'expression de p27 et à l'entrée en phase S du cycle cellulaire des cellules IEC-6 (Rivard et al., 1999). Par conséquent, combinées, ces modulations à la hausse dans l'expression des protéines formant les complexes cycline D1/cdk4 et cycline E/cdk2, la diminution d'expression de l'inhibiteur p27 en plus de la non-induction des protéines p53 et p16<sup>INK4A</sup> pourraient facilement expliquer l'hyperphosphorylation partielle de pRb observée dans les cellules IEC-6-MEK CA post-confluentes (Papier 1, Figure

2E). Cependant, pour l'instant, nous ne pouvons prouver indubitablement que seules ces modulations dans l'expression de protéines régularisant le cycle cellulaire expliquent la forte capacité proliférative des cellules IEC-6-MEK CA. Dans le but de trouver de nouvelles cibles de la MEK CA qui pourraient participer à la prolifération et à la transformation des cellules IEC-6-MEK CA, nous avons procédé à des extractions d'ARNm puis à l'analyse par micropuces des ARNm induits dans les cellules IEC-6-MEK CA versus IEC-6-MEK WT. Jusqu'à présent, les premières analyses pourraient s'avérer fort intéressantes (Tableau 1). D'abord, nous étions ravies de constater une augmentation de l'ARNm de la cycline D1 ( $2.12 \pm 0.50$ ) dans les cellules IEC-6-MEK CA, appuyant nos résultats d'expression protéique et nous donnant de l'espoir en les futurs candidats identifiés grâce à cette méthode d'analyse par micropuces. Comme on peut le constater à partir du Tableau 1, l'expression de plusieurs ARNm codant pour des protéines impliquées dans la composition ou dans le remodelage de la matrice extracellulaire est affectée. On dénote également une variation dans l'expression d'un récepteur aux composants de la matrice : l'intégrine alpha-6. Dans les cellules IEC-6-MEK CA, nous avons montré qu'il y avait une perte d'inhibition de contact (Papier 1, Figure 2D). Le signal entraînant l'inhibition de contact peut émaner des jonctions adhérentes fonctionnelles. Ainsi, la diminution d'expression de cadhérines (cadhérine 11 et cadhérine 3) et d'une protéine décrite pour contribuer à la formation et à la stabilité de la jonction adhérente fonctionnelle, ajuba (Marie et al., 2003),

	Expression DIMINUÉE dans les IEC-6-MEK CA	Expression AUGMENTÉE dans les IEC-6-MEK CA
<b>MATRICE EXTRACELLULAIRE</b>	Procollagen c-proteinase enhancer protein (2.31±0.47)  Pro-collagène, type I, alpha 2 (2.46±0.78)  Précurseur de la chaîne de Collagène alpha 1(I) (2.93±0.34) Précurseur de la chaîne de Collagène alpha 1(III) (7.88±3.45)  Précurseur du protéoglycan I (biglycan) (2.13±0.59)  Syndécan 2 (2.01±0.07)  Précurseur de l'inhibiteur de Métallo-protéinase 3 (TIMP-3) (3.48±0.69)  Inhibiteur de métallo-protéinase 2 (TIMP2) (2.19±0.33)	Pro-collagène, type VI, alpha 2 (6.90±2.77) Pro-collagène, type XVIII, alpha 1 (1.38±0.09)        Syndécan 1 (3.20±0.36)
<b>ADHÉSION</b>	Cadhérine 3 (3.45±0.86)  Cadhérine 11 (2.19±0.62)  ajuba (2.09±0.56)	Précurseur de l'Intégrine alpha-6 (VLA-6) (3.18±1.62)
<b>TRANSCRIPTION</b>		HMG-Y (9.23±2.61)  cdk 8 (9.85±3.47)
<b>PROLIFÉRATION</b>		Cycline D1 (2.12±0.50)
<b>AUTRES</b>		Peroxiredoxine 6 (4.01±1.45)  Protéine tyrosine-phosphatase 4A1 (3.54±1.59)

**TABLEAU 1. ANALYSE PAR MICROPUCES DES ARNm MODULÉS DANS LES CELLULES IEC-6-MEK CA**

L'ARNm des IEC-6-MEK WT et IEC-6-MEK CA a été isolé et analysé à l'Institut de recherche en biotechnologie de Montréal à l'aide d'une micropuce de 15000 gènes (souris) provenant du Microarray Center, Clinical Genomics Center, University of Toronto. Les résultats issus de deux analyses effectuées en duplicata ont été compilés et seuls les gènes présentant une variation significative d'au moins deux fois sont présentés.

s'avèrent des candidats intéressants qui pourraient contribuer au non-arrêt de prolifération des cellules IEC-6-MEK CA à l'atteinte de la confluence. La modulation importante de l'ARNm de HMG-Y constitue également une avenue originale à étudier. Les protéines HMG sont des protéines chromosomales non-histones qui jouent un rôle général dans la modulation de l'expression génique au cours du développement (Liu et al., 2001). De plus, il a été démontré qu'une sur-expression ou une expression aberrante des protéines de la famille HMG était fréquemment associée avec la transformation néoplasique et la progression métastatique (Reeves et al., 2001). La cdk8 constitue elle aussi une protéine impliquée dans la régulation de la transcription. La phosphorylation de l'ARN polymérase II par le complexe cycline C/cdk8 favorise l'élongation efficace des ARN (Sausville, 2002). Quant à la peroxyredoxine 6, deux autres membres de la famille, la peroxyredoxine 2 et 4 ont récemment été identifiées comme des gènes pouvant jouer un rôle dans la survie cellulaire et l'initiation de la carcinogenèse dans les cellules d'origine épithéliale intestinale (Crowley-Weber et al., 2002). Il sera donc intéressant dans l'avenir de confirmer l'induction des ARNm en inductions protéiques et de les corrélérer avec la prolifération cellulaire et/ou la transformation cellulaire.

### 1.3. RÉGULATION DES ERK ENDOGÈNES PAR LA MEK CA DANS LES CELLULES HIEC ET IEC-6

Dans nos études, la forme constitutive active de MEK1 exprimée dans les HIEC et les IEC-6 présente une activité catalytique de l'ordre de trente fois supérieure à l'activité de la MEK WT (Papier 1, Figure 1B). Malgré cette forte activité MEK1 dans les cellules HIEC-MEK CA et IEC-6-MEK CA, cela ne se reflète pas sur ses substrats endogènes ERK1 et ERK2 (Papier 1, Figure 5). En effet, nous avons observé une légère augmentation (environ 1.5 fois) de la phosphorylation des ERK1/2 dans les cellules HIEC-MEK CA et IEC-6-MEK CA privées en sérum. De plus, aucune modulation de la phosphorylation des ERK1/2 n'est observée suite à l'ajout de sérum, alors que les populations contrôles HIEC-MEK WT et IEC-6-MEK WT répondent très bien à la stimulation par le sérum. À prime abord, ces résultats semblent contradictoires. Cependant, nos résultats sont en accord avec d'autres résultats de la littérature qui ont montré un délai (Greulich et al., 1996) ou une atténuation dans l'activation des ERK1/2 suite à une stimulation par le sérum (Gopalbhai et Meloche, 1998; Greulich et Erickson, 1998; Stofega et al., 1997) ou au PDGF (Samuels et McMahon, 1994) dans les cellules transformées par des oncogènes. L'absence d'activation des ERK1/2 suite à l'ajout de sérum pourrait peut-être s'expliquer, en partie, par le fait qu'une MEK CA est toujours active et qu'elle n'est pas influencée par les signaux extracellulaires. Cette hypothèse devrait être vérifiée dans nos cellules.

Cependant, Greulich et Erickson (1998) ont effectivement montré que l'activité d'une MEK CA inductible n'était pas affectée par une stimulation au sérum. Néanmoins, cela n'explique pas pourquoi nous ne remarquons pas d'effet plus marqué sur l'activité des ERK1/2 endogènes en condition basale et pourquoi la MEK endogène ne permet pas une certaine activation des ERK1/2 suite à une stimulation des cellules par le sérum. Une hypothèse serait que, suite à une stimulation permanente par une MEK CA, la cascade MEK/ERK se désensibilise et devient réfractaire à la présence de la MEK CA ou d'une MEK activée stimulée par le sérum. Cette désensibilisation pourrait faire intervenir une phosphorylation de MEK (sur les thréonines 292 et 386 ou la sérine 212) ce qui peut inhiber l'activité de MEK *in vitro* et *in vivo* (Brunet et al., 1994; Gopalbhai et al., 2003). Cependant, tout en n'excluant pas que ce phénomène puisse se produire *in vivo* dans nos cellules, la MEK CA exprimée dans les HIEC-MEK CA et IEC-6-MEK CA, lorsqu'immunoprécipitée, démontre, *in vitro*, une activité considérable envers son substrat ERK2 (Papier 1, Figure 1B). Une seconde possibilité est la participation des phosphatases qui viendraient contrôler l'activité des ERK1/2 suite à leur activation par la MEK CA et ainsi, tenter de diminuer le stress mitogénique. Des candidats potentiels sont les MKP. Cependant, des résultats préliminaires n'ont indiqué aucune variation dans l'expression des MKP-1 et MKP-3 dans les cellules HIEC-MEK CA et IEC-6-MEK CA par rapport aux cellules contrôles (MEK WT). D'autres candidats pourraient être PTP-ER, une phosphatase jouant un rôle négatif dans la signalisation de Ras1 chez la

Drosophile (Karim et Rubin, 1999) ou encore une tyrosine phosphatase non-identifiée décrite pour réprimer l'activité des ERK1/2 dans les fibroblastes de rat transformés par des oncogènes (Gopalbhai et Meloche, 1998). La participation des phosphatases dans la régulation négative de la cascade MEK/ERK dans nos cellules HIEC-MEK CA et IEC-6-MEK CA devra donc être investiguée plus en profondeur. De plus, il faudrait vérifier l'hypothèse voulant que la présence d'une MEK CA influence l'expression d'une protéine, comme par exemple une protéine d'échafaudage, qui pourrait découpler la transmission du signal entre la MEK1 et les ERK1/2 endogènes. On pourrait penser à une diminution de l'expression de MP1 ou KSR1. Ces protéines peuvent favoriser l'activation des ERK par MEK dans certains systèmes (Muller et al., 2001; Schaeffer et al., 1998). La participation de SOS dans l'inactivation de la cascade MEK/ERK suite à une stimulation par des facteurs de croissance pourrait également être intéressante à étudier. En effet, il a préalablement été rapporté qu'un mécanisme de rétro-contrôle négatif ERK-dépendant limitait la durée d'activation de Ras suite à la stimulation des cellules avec l'insuline, le PDGF ou l'EGF (Cherniack et al., 1994; Cherniack et al., 1995; Langlois et al., 1995; Waters et al., 1995). Ce mécanisme de rétro-contrôle implique la phosphorylation du facteur d'échange pour Ras, SOS, ce qui entraîne la dissociation du complexe Grb2-SOS et empêche ainsi la formation de Ras-GTP (Cherniack et al., 1994; Cherniack et al., 1995; Langlois et al., 1995; Waters et al., 1995). L'absence de Ras-GTP ne permet donc plus aux signaux extracellulaires d'activer la cascade de signalisation

intracellulaire Ras/Raf/MEK/ERK. Ce mécanisme de rétro-contrôle a initialement été attribué aux ERK puisque 1- la sur-expression d'une ERK peut induire l'hyper-phosphorylation de SOS suite à une stimulation par des facteurs de croissance (Ueki et al., 1994) et 2- SOS peut être phosphorylé *in vitro* par une ERK active purifiée (Cherniack et al., 1994; Waters et al., 1995). Cependant, il a par la suite été démontré que SOS pouvait être phosphorylé par un mécanisme MEK-dépendant et ERK-indépendant (Holt et al., 1996). Ainsi, on pourrait penser que la présence d'une MEK CA entraîne la phosphorylation de SOS ce qui pourrait expliquer la non-activation des ERK par la MEK endogène suite à une stimulation des cellules par le sérum. Finalement, les premières analyses de micropuces ont également fait ressortir un nouveau candidat dont il serait intéressant de vérifier son implication dans la régulation de la cascade MEK/ERK. En effet, ajuba a récemment été identifiée comme une protéine liant l' $\alpha$ -caténine et participant à la formation et à la stabilité de la jonction adhérente (Marie et al., 2003). Cependant, les premières études avaient révélé que, dans les fibroblastes exprimant ajuba, l'activation des ERK suite à une stimulation par le sérum était de 5 fois supérieure à l'activation des ERK amenée par le sérum dans les fibroblastes n'exprimant pas ajuba (Goyal et al., 1999). Dans ce cas, il semblerait que l'association d'ajuba avec la protéine adaptatrice Grb2 favorise l'activation de la cascade MEK/ERK dans les cellules stimulées par le sérum (Goyal et al., 1999). Ainsi, on pourrait proposer que la diminution d'expression d'ajuba dans les cellules exprimant une MEK CA réduit l'activation de la cascade



MEK/ERK suite à une stimulation par le sérum. En résumé, je crois qu'il serait bon de doser l'activité de tous les effecteurs de la cascade, Ras, Raf et MEK, suite à une stimulation par le sérum pour pouvoir identifier à quel niveau la transmission du signal extracellulaire est bloqué.

Une observation intéressante dans nos études est la détection, à l'aide d'un anticorps spécifique qui ne reconnaît que les ERK1/2 doublement phosphorylés, d'une troisième bande de poids moléculaire d'environ 46kDa dans les cellules IEC-6 (Papier 1, Figure 5D). De plus, avec un anticorps spécifique qui reconnaît les formes non-phosphorylées et phosphorylées (expression totale) de ERK1, nous pouvons détecter cette bande à 46kDa. Lorsque le gel est bien résolu et l'immunobuvardage parfait, nous pouvons même apercevoir la différence de migration entre la forme non-phosphorylée et phosphorylée de cette troisième bande. En effet, lorsqu'un signal à 46kDa est détecté avec l'anticorps phospho-spécifique, on voit un doublet avec l'anticorps total et lorsqu'il n'y a aucun signal à 46kDa avec l'anticorps phospho-spécifique, on ne détecte qu'une seule bande avec l'anticorps qui reconnaît la forme totale de ERK1. Étant donné cette spécificité, nous avons éliminé l'hypothèse du marquage non-spécifique et plutôt émis et confirmé l'hypothèse que ce marquage correspondait à la protéine ERK1b. Cette protéine est très peu connue; deux seuls papiers dans la littérature lui consacrent de l'intérêt (Yung et al., 2000; Yung et al., 2001). Chez le rat, ERK1b est un produit issu de l'épissage alternatif du gène de ERK1 donnant un ARNm identique à ERK1 mais possédant en plus une insertion de 78

nucléotides entre les bases 1020 et 1021. La protéine qui en résulte contient une insertion de 26 acides aminés en C-terminale du domaine kinase. La masse moléculaire théorique de ERK1b est de 45.6kDa renforçant ainsi notre hypothèse que la bande détectée dans les cellules IEC-6 à environ 46kDa pourrait être ERK1b.

Contrairement aux ERK1 et ERK2 dont l'expression est ubiquiste, il a été décrit que l'expression de ERK1b variait d'un tissu à l'autre (Yung et al., 2000). Comme l'expression de ERK1b n'avait jamais été évaluée au niveau de l'intestin, nous avons vérifié si l'ARNm de ERK1b était présent dans les cellules épithéliales intestinales. Utilisant les mêmes oligonucléotides que Yung et al. (2000), nous avons effectivement détecté la présence de l'ARNm correspondant à ERK1b à la fois dans la muqueuse de l'épithélium intestinal de rat et dans les lignées cellulaires IEC-6-MEK WT et IEC-6-MEK CA (Papier 1, Figure 5E).

Ce qui est particulièrement intéressant dans nos résultats, est la corrélation entre la prolifération des IEC-6 et la détection de la forme phosphorylée et active de ERK1b. En effet, dans les cellules IEC-6-pLXIN et IEC-6-MEK WT, la forme doublement phosphorylée de ERK1b est visualisée dans les cellules sous-confluentes prolifératives et disparaît lorsque les cellules atteignent la confluence et cessent de proliférer. Dans les cellules IEC-6-MEK CA qui prolifèrent toujours après l'atteinte de la confluence, un fort signal correspondant à la forme doublement phosphorylée de ERK1b demeure présent en tout temps peu importe l'état de confluence (Papier 1,

Figure 5D). Cela suggère que ERK1b pourrait jouer un rôle dans la prolifération, dans la perte d'inhibition de contact et la transformation des cellules IEC-6-MEK CA. En ce sens, les quelques études concernant ERK1b (Yung et al., 2000; Yung et al., 2001), ont rapporté que 1- l'expression de ERK1b est plus élevée dans les cellules transformées, 2- le niveau d'induction de l'activité des ERK suite à un stimulus est plus important pour ERK1b que ERK1 dans les cellules transformées par Ras suggérant que ERK1b est l'isoforme qui répond aux stimulations exogènes et qui médie les réponses physiologiques dans les cellules transformées, 3- l'expression d'un gène rapporteur Elk1-luciférase, une cible des ERK, est plus fortement induite par ERK1b que ERK1 et 4- ERK1b est plus résistante à l'action des phosphatases que ERK1.

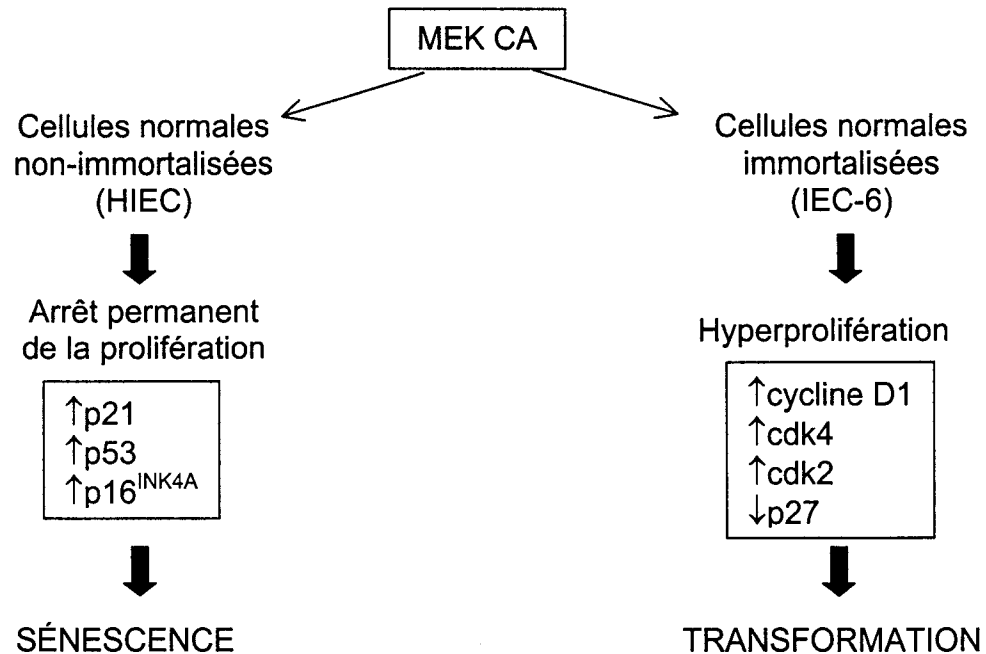
Dans notre cas, nous n'avons pas détecté de différence dans les niveaux d'expression de l'ARNm et de la protéine ERK1b entre les différentes populations IEC-6. Cependant, l'activité de ERK1b est maintenue élevée dans les cellules IEC-6-MEK CA après l'atteinte de la confluence alors que son activité diminue dans les cellules IEC-6-pLXIN et IEC-6-MEK WT. D'autres auteurs (Gopalbhai et Meloche, 1998; Greulich et Erickson, 1998; Yung et al., 2000; Yung et al., 2001) et nous-mêmes avons préalablement suggéré une participation de phosphatases dans la régulation négative des ERK1/2 en présence d'oncogènes dans le but d'atténuer la signalisation par les ERK1/2. Ainsi, il est possible que dans les cellules IEC-6-MEK CA, il y ait une induction d'expression et/ou d'activité de phosphatases réussissant à

contrôler la trop forte activation des ERK1/2 par la MEK CA. Cependant, la ERK1b étant plus résistante à l'action des phosphatases, elle est continuellement activée par la MEK CA. Par conséquent, dans les cellules IEC-6-MEK CA, peu importe les conditions, ERK1b est capable d'activer ses substrats qui pourraient influencer positivement la prolifération cellulaire. Étant donné le peu d'études concernant la protéine ERK1b et à la lumière de nos résultats, il serait extrêmement intéressant d'approfondir son étude. J'ai déjà procédé au clonage de ERK1b à partir d'ADNc préparé à partir de la muqueuse de l'épithélium intestinal de rat et je l'ai inséré dans un vecteur rétroviral. Cependant, malgré une séquence nucléotidique correcte révélée suite au séquençage, j'ai éprouvé certaines difficultés à l'exprimer dans des cellules de mammifères. Je crois qu'il faudrait s'attarder à solutionner ce problème et étudier les impacts de ERK1b dans les cellules épithéliales intestinales. 1- Vérifier l'impact d'une sur-expression seule de ERK1b dans les cellules IEC-6. 2- Sur-exprimer la ERK1b dans les cellules IEC-6-MEK CA et vérifier si la prolifération cellulaire et la transformation des cellules sont augmentées. 3- À l'inverse, inhiber l'expression de ERK1b par interférence d'ARN dans les cellules IEC-6-MEK CA et vérifier si cela altère le phénotype transformé des cellules. 4- Également, il serait intéressant d'exprimer cette ERK1b dans les cellules HIEC ou HIEC-MEK CA et en étudier les conséquences. En résumé, je crois que tout est à faire avec cette nouvelle isoforme de ERK1.

Une autre question mériterait d'être répondue : qu'en est-il de ERK1b dans les cellules épithéliales intestinales humaines? À l'aide des mêmes anticorps que nous avons utilisés chez le rat, nous avons été dans l'impossibilité de déceler la présence de signal à 46kDa dans les cellules HIEC et ce, peu importe les conditions expérimentales. Les résultats obtenus par Yung et al. (2000), leur ont permis de suggérer que la protéine ERK1b était surtout présente dans les cellules dérivées de rat, mais pouvait également être retrouvée, en quantité plus faible, dans certaines lignées cellulaires provenant d'autres espèces comme la souris, le veau, le cochon-d'Inde et l'humain. Par contre, pour détecter ERK1b chez l'humain, ils ont utilisé les cellules humaines MCF-7 dérivées d'un cancer du sein. Comme ils suggèrent également que l'expression de ERK1b est augmentée dans les cellules transformées, on pourrait penser que la protéine ERK1b n'est présente qu'en quantité très faible dans les cellules normales humaines rendant difficile la détection de ERK1b dans les HIEC. Malgré notre incapacité à détecter la protéine ERK1b, nous avons tenté de montrer la présence d'un ARNm ERK1b dans les cellules épithéliales intestinales humaines. Cependant, actuellement, l'isoforme ERK1b chez l'humain n'a jamais été clonée. Les évidences qu'une ERK1b pourrait être présente dans les cellules humaines reposent sur les observations 1- qu'une bande à 46kDa est détectée par des anticorps dirigés contre la forme phosphorylée et totale des ERK1/2 dans des cellules cancéreuses humaines MCF-7 et 2- qu'un signal est obtenu en northern blot suite à l'hybridation d'ARNm humains avec

une sonde correspondant à l'insertion de 78 nucléotides de ERK1b chez le rat. Par alignement de séquence avec la ERK1 de rat et la ERK1 humaine, nous avons supposé que l'insertion, si présente chez l'humain, se situerait à un endroit similaire chez le rat et l'humain. Nous avons donc préparé des oligonucléotides, correspondant à la séquence humaine de ERK1, équivalent aux oligonucléotides utilisés pour détecter ERK1b chez le rat. Cependant, nous avons été dans l'impossibilité, jusqu'à présent, de prouver l'existence d'un ARNm ERK1b dans des cellules humaines normales. Il n'est pas exclu qu'une ERK1b soit exprimée chez l'humain, cependant son expression à des niveaux plus faibles rend peut-être sa détection plus difficile. Ainsi, réussir à cloner une ERK1b chez l'humain serait un autre défi très intéressant à relever.

En conclusion générale, je dirais que dans les cellules normales, l'activation de la cascade MEK/ERK est nécessaire mais non suffisante à la prolifération des cellules épithéliales cryptales intestinales. Cependant, combinée à certaines mutations pouvant affecter p53 et/ou p16<sup>INK4A</sup>, l'activation de la cascade MEK/ERK peut devenir un dangereux signal mitogénique et contribuer à la tumorigenèse des cellules épithéliales intestinales. Une fine régulation de la cascade MEK/ERK est donc nécessaire pour contrôler l'homéostasie tissulaire de l'épithélium intestinal. Une récapitulation des résultats obtenus à l'aide du mutant MEK CA est illustrée à la figure 8.



**FIGURE 8. EFFETS DE L'EXPRESSION D'UNE MEK CA DANS LES CELLULES ÉPITHÉLIALES CRYPTALES INTESTINALES.**

L'expression stable d'une MEK CA dans les cellules HIEC a mené à un arrêt permanent de la prolifération qui est accompagné d'une augmentation d'expression des inhibiteurs p21, p53 et p16<sup>INK4A</sup>. Nous avons qualifié cet état cellulaire de sénescence prématurée. Dans les cellules IEC-6, l'expression d'une MEK CA conduit à une hyperprolifération. Certains candidats tels que l'augmentation d'expression de la cycline D1, de cdk4, de cdk2 et la diminution d'expression de p27 pourraient contribuer à l'hyperprolifération des cellules IEC-6-MEK CA. Les cellules IEC-6-MEK CA semblent donc avoir subi une transformation cellulaire.

## **2. LA CASCADE MEK/ERK DANS LA BORDURE EN BROSSE DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL PARTICIPE À LA PHYSIOLOGIE DE LA CELLULE ÉPITHÉLIALE INTESTINALE DIFFÉRENCIÉE.**

Les études dans le laboratoire du Dr. Rivard avaient montré qu'une diminution de l'activité des ERK1/2 après l'atteinte de la confluence des cellules de cancer de colon humain Caco-2/15 corrèle avec l'induction d'une différenciation de type entérocytaire (Aliaga et al., 1999). De plus, ces études précédentes avaient montré que l'inhibition de l'activité résiduelle des ERK1/2 dans les cellules confluentes interfère avec l'expression du marqueur de différenciation sucrase-isomaltase suggérant un rôle des ERK1/2 dans les cellules épithéliales intestinales différenciées. Il avait également été rapporté, en immunofluorescence, dans l'épithélium intestinal de poulet (Mamajiwalla et Burgess, 1995) et de fœtus humain (Aliaga et al., 1999), une localisation apicale des ERK1/2 dans les cellules épithéliales intestinales différenciées de la villosité. Dans le but de clarifier le rôle de la cascade MEK/ERK dans les cellules épithéliales intestinales différenciées, nous avons d'abord évalué la localisation cellulaire de composants ou de modulateurs de la cascade MEK/ERK dans les cellules épithéliales intestinales différenciées. Par fractionnements biochimiques, nous avons confirmé la présence des ERK1/2 et de ses régulateurs possibles, Ras, MEK1, p85 PI3K, AKT, Rac1 et PKC $\alpha$  dans la bordure en brosse des cellules épithéliales intestinales humaines et de rat (Papier 2, Figures 1D, 2C). De plus, de façon plus marquée dans les cellules épithéliales intestinales différenciées normales (intestin fœtal humain



et intestin de rat), l'activité des ERK1/2 est davantage confinée aux fractions membranaires dont la fraction contenant l'enrichissement des éléments de la bordure en brosse (Papier 2, Figures 1B, 2C). Cette localisation des ERK1/2 phosphorylés dans le compartiment apical des cellules épithéliales intestinales différenciées diffère de la localisation nucléaire des ERK1/2 actives dans les cellules épithéliales intestinales de la crypte (Aliaga et al., 1999) suggérant des substrats et des rôles différents de la cascade MEK/ERK dans les cellules prolifératives et les cellules différenciées de l'épithélium intestinal. Je serais très intriguée d'étudier de façon plus approfondie la localisation des ERK1/2 actives suite à une stimulation de la cascade MEK/ERK dans les cellules épithéliales intestinales différenciées. En effet, dans les cellules non-différenciées de la crypte de l'épithélium intestinal, on retrouve des ERK1/2 actives dans le noyau de ces cellules (Aliaga et al., 1999). Dans les fibroblastes, l'entrée et l'accumulation dans le noyau des ERK1/2 sont des étapes indispensables à la réplication de l'ADN induite par les facteurs de croissance (Brunet et al., 1999; Kim-Kaneyama et al., 2000). Le traitement des cellules épithéliales intestinales indifférenciées avec le sérum ou l'EGF stimule effectivement la prolifération cellulaire (Aliaga et al., 1999; Rivard et al., 1999). Ainsi, on pourrait penser que dans les cellules épithéliales intestinales indifférenciées, une stimulation par le sérum ou par l'EGF amène une translocation nucléaire des ERK1/2 requise pour le processus de prolifération. Cependant, dans les cellules épithéliales intestinales différenciées de la villosité, il est évident que pour maintenir

l'homéostasie de l'épithélium intestinal, les activateurs de la cascade MEK/ERK ne doivent pas être interprétés comme signaux mitogéniques. Je crois donc que l'activation des ERK1/2 dans les cellules épithéliales intestinales différenciées ne permettrait pas nécessairement la translocation nucléaire des ERK1/2. Il a d'ailleurs été suggéré que la rétention des ERK dans le cytoplasme jouait un rôle critique dans le maintien du phénotype différencié de certains types cellulaires (Pouyssegur et al., 2002). Si dans les cellules épithéliales intestinales différenciées une activation des ERK ne conduit pas à leur translocation nucléaire, il serait fort intéressant d'étudier les mécanismes permettant la rétention cytoplasmique des ERK suite à leur activation. Il a déjà été rapporté dans les astrocytes qu'une augmentation de l'expression de PEA15 trappait les ERK1/2 dans le cytoplasme et bloquait la prolifération cellulaire (Formstecher et al., 2001). Une autre avenue qui serait intéressante à explorer est l'implication des beta-arrestines dans la signalisation de la cascade MEK/ERK dans les cellules épithéliales intestinales différenciées. En effet, il a été démontré que les beta-arrestines s'associaient avec les ERK et augmentaient l'activité des ERK cytoplasmiques tout en inhibant la transcription médiée par les ERK (Tohgo et al., 2002).

Nous avons également montré que certains stimuli, tels que l'EGF, le  $TNF\alpha$ , l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et la prise de nourriture, augmentaient l'activité des ERK1/2 dans chacune des fractions cellulaires sans moduler l'expression totale des ERK1/2 dans ces fractions (Papier 2, Figures 2B, 2C). Ces

résultats suggèrent que, suite à un stimulus, il pourrait y avoir activation de plusieurs cascades MEK/ERK dans différents compartiments de la cellule. Chacune des cascades MEK/ERK activée pourrait influencer un substrat particulier afin de permettre une réponse cellulaire bien précise. Dans les cellules normales épithéliales intestinales de rat, une activation des ERK1/2 suite à la prise de nourriture est surtout observée dans la fraction enrichie en éléments de la bordure en brosse (Papier 2, Figure 2C) suggérant un rôle important de la cascade MEK/ERK dans la régulation de fonctions associées à la bordure en brosse dans l'épithélium intestinal *in vivo*.

Très peu d'études ont prouvé la présence de la cascade MEK/ERK dans une structure spécialisée telle la bordure en brosse. Mis à part une localisation apicale des ERK1/2 en immunofluorescence dans l'épithélium intestinal (Aliaga et al., 1999; Mamajiwalla et Burgess, 1995), une autre étude a montré par fractionnements biochimiques une association de Ras/Raf/MEK/ERK avec les microfilaments d'actine des microvillosités des cellules ascites isolées d'un adénocarcinome de glande mammaire de rat (Carraway et al., 1999). Il est intéressant de noter que certains substrats potentiels de la cascade MEK/ERK ont été identifiés au niveau de la bordure en brosse de l'épithélium intestinal. En autres, la cPLA2 a été localisée au niveau de la surface apicale des entérocytes et elle peut être phosphorylée et activée par les ERK1/2 (Lin et al., 1993). La MLCK, présente dans la bordure en brosse de l'épithélium intestinal (Rieker et Collins, 1987; Louvard et al., 1992), peut également être phosphorylée et activée par les ERK1/2 (Klemke

et al., 1997). De plus, la caldesmone et la cortactine, deux protéines capables de lier l'actine et pouvant être régularisées par les ERK1/2 (Campbell et al., 1999; Childs et al., 1992; D'Angelo et al., 1999; Redwood et al., 1993) ont respectivement été localisées au niveau de la bordure en brosse de l'épithélium intestinal de rat et de l'humain (Rochette-Egly et Haffen, 1987; Wu et Montone, 1998). Finalement, il a récemment été démontré que la tropomyosine, pouvant être retrouvée dans le réseau terminal des entérocytes (Louvard et al., 1992), pouvait être phosphorylée par les ERK1/2 ce qui altérerait son association avec l'actine (Houle et al., 2003). Ainsi, l'association des ERK1/2 au cytosquelette des cellules que nous avons détectée dans les cellules épithéliales intestinales différenciées (Papier 2, Figure 3C) en plus de la présence de la cascade MEK/ERK dans la bordure en brosse (Papier 2, Figures 1B-D) suggèrent que cette cascade de signalisation pourrait contrôler localement la dynamique des microfilaments d'actine de la bordure en brosse de l'épithélium intestinal.

Depuis plusieurs années, le cytosquelette de la bordure en brosse n'est plus considéré comme une simple structure maintenant l'architecture de la surface apicale des entérocytes. Il participe activement aux processus d'absorption des nutriments et de contrôle de la perméabilité cellulaire (Holmes et Lobley, 1989). Dans la présente étude, nous avons montré 1- une diminution de l'activité des ERK1/2 de la bordure en brosse de l'épithélium intestinal lorsque des rats sont mis à jeûn pour la nuit (résultats non-montrés), et 2- une augmentation importante de l'activité des ERK1/2 de la bordure en

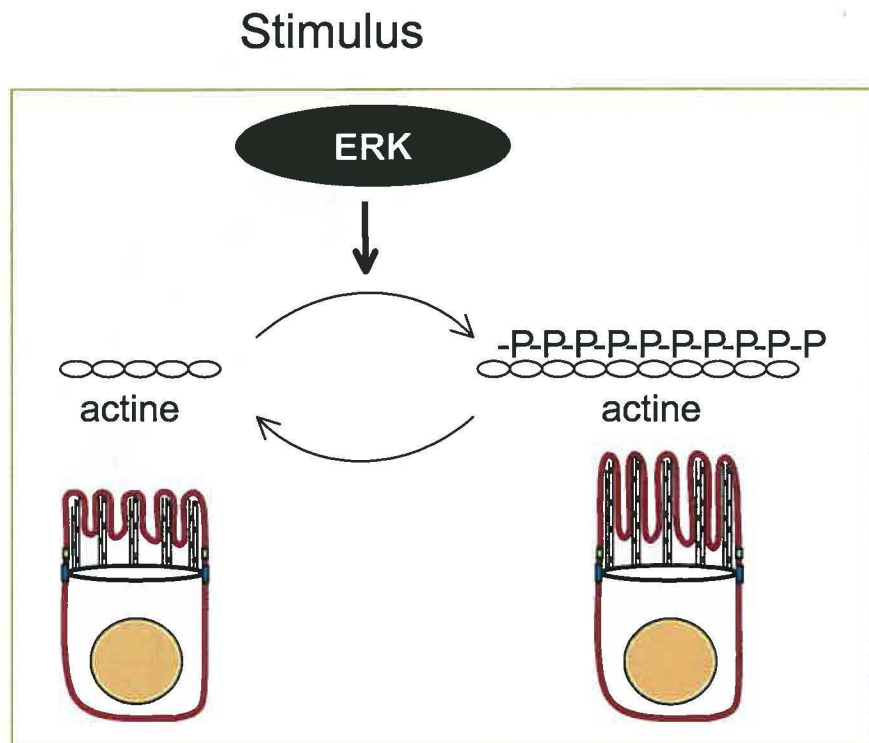
brosse 3h après la prise de nourriture par les rats (Papier 2, Figure 2C) au moment où les processus de digestion et d'absorption des nutriments sont bien entamés (Go et al., 1986). Ces résultats suggèrent que 1- l'absence ou la présence d'un contenu dans la lumière intestinale peut influencer l'activité des ERK1/2 de la bordure en brosse et 2- que les ERK1/2 pourraient participer aux processus de digestion et d'absorption. Il a récemment été proposé qu'après un repas, l'entrée du glucose par les transporteurs Na<sup>+</sup>-glucose amène une activation de la PKC  $\beta$ II (un activateur potentiel de la cascade MEK/ERK) et une contraction de l'anneau d'actine péri-jonctionnelle (potentiellement contrôlée par le substrat des ERK1/2, la MLCK, Turner et al., 1999) responsable de l'arrondissement de la surface apicale des cellules absorbantes et de l'altération de la structure des jonctions serrées (Kellett, 2001). Il a aussi été suggéré qu'une balance entre l'activité des ERK1/2, de la p38 MAPK et de la PI3K joue un rôle important dans le contrôle du transport du fructose chez le rat (Kellett, 2001). L'EGF (un facteur de croissance bien connu pour stimuler la cascade MEK/ERK) a également été décrit comme un modulateur positif de l'absorption (Chung et al., 1999; Hardin et al., 1993; Opleta-Madsen et al., 1991).

Nos résultats montrent une altération de l'architecture des microvillosités suite à une inhibition de la cascade MEK/ERK dans les cellules Caco-2/15 (Papier 2, Figure 4). Ces données sont très intéressantes dans le contexte où d'autres études ont montré une modulation de la longueur des microvillosités par l'alimentation (Goda et al., 1994; King et al., 1983) et l'EGF

(Hardin et al., 1993). D'ailleurs, le phénotype adopté par les microvillosités suite à l'inhibition de la cascade MEK/ERK dans les Caco-2/15 ressemble beaucoup au phénotype des microvillosités visualisé chez le rat mis à jeûn toute la nuit (Martins et al., 2001). De façon encore plus intéressante, nous observons une diminution de l'activité des ERK1/2 de la bordure en brosse de l'épithélium intestinal chez les rats mis à jeûn toute la nuit (résultats non montrés) et une augmentation de l'activité des ERK1/2 de la bordure en brosse après la prise de nourriture (Papier 2, Figure 2C). Pris ensemble, ces résultats suggèrent que la cascade MEK/ERK présente à la surface apicale des entérocytes pourrait contrôler l'absorption des nutriments via son influence sur la structure et la dynamique des microvillosités.

Le mécanisme par lequel la cascade MEK/ERK altère la structure des microvillosités demeure toutefois inconnu. Nos résultats suggèrent que l'actine de la bordure en brosse des entérocytes pourrait être phosphorylée sur résidu sérine par les ERK1/2 ou par un mécanisme dépendant de l'activité de la cascade MEK/ERK (Papier 2, Figures 3A-B). Une phosphorylation de l'actine sur résidu sérine a déjà été rapportée dans les cellules A431 et HER14 suite à une stimulation par l'EGF (Van Delft et al., 1995). Il a été suggéré que la phosphorylation de l'actine pourrait favoriser l'interaction avec d'autres protéines. De plus, il y a certaines indications dans la littérature qui suggèrent que la phosphorylation de l'actine sur résidu sérine favorise la polymérisation de l'actine (Otha et al., 1987). Ainsi, on pourrait proposer que l'activation des ERK1/2 de la bordure en brosse de l'épithélium intestinal

pendant la prise de nourriture 1-permet la phosphorylation de l'actine, 2-favorise la polymérisation de l'actine, 3- permet l'allongement des microvillosités augmentant par conséquent la surface d'absorption et favorisant ainsi les processus d'absorption (voir figure 9.). Comme nos résultats n'ont établi que des corrélations, des études futures pourraient prévoir de 1- confirmer l'actine comme substrat direct des ERK1/2, 2- et d'étudier les effets sur les fonctions de l'actine suite à sa phosphorylation par les ERK1/2.



**FIGURE 9. MODÈLE PROPOSÉ SUR LE RÔLE DE L'ACTIVATION DE LA CASCADE MEK/ERK DANS LA BORDURE EN BROSSE DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL.**

Suite à un stimulus, l'activation de la cascade MEK/ERK pourrait permettre la phosphorylation de l'actine favorisant la polymérisation de l'actine et permettant ainsi l'allongement des microvillosités. Ces modulations de la surface de la membrane apicale pourraient favoriser les processus de digestion et d'absorption au niveau du petit intestin.



### **3. UNE FORTE ACTIVITÉ DE LA CASCADE AMPc/PKA MODULE NÉGATIVEMENT LA DIFFÉRENCIATION ÉPITHÉLIALE INTESTINALE EN PERTURBANT L'ASSEMBLAGE DES JONCTIONS ADHÉRENTES.**

Dans un troisième temps, nous avons analysé l'effet de l'activation de la cascade AMPc/PKA sur la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Nous avons montré qu'une forte concentration intracellulaire d'AMPc inhibe la différenciation fonctionnelle et morphologique des cellules Caco-2/15. En effet, le traitement avec l'analogue perméable de l'AMPc, le 8Br-cAMP, bloque l'induction d'expression des marqueurs de différenciation entérocytaire sucrase-isomaltase et villine (Papier 3, Figure 1B). De plus, par analyse en microscopie électronique, nous avons noté une réduction de polarité cellulaire et de bordure en brosse dans les cellules traitées au 8Br-cAMP (Papier 3, Figure 1C).

Une régulation négative de la différenciation par la cascade AMPc/PKA a récemment été rapportée dans d'autres modèles cellulaires. Dans les cellules du tube collecteur proximal médullaire de la souris, l'addition de 8Br-cAMP inhibe la tubulogenèse alors que l'inhibiteur de la PKA, le H89, la promeut (Gupta et al., 1999). Dans les 3T3-L1, l'inhibition de la différenciation adipocytaire par l'acide arachidonique nécessite la présence d'agents élévateurs d'AMPc dans le cocktail adipogénique alors que la présence du H89 permet la différenciation des cellules traitées à l'acide arachidonique (Petersen et al., 2003). La liaison du collagène I avec ses récepteurs

intégrines inhibe l'activité de la cascade AMPc/PKA et permet la morphogenèse des cellules endothéliales (Whelan et Senger, 2003). Dans les cellules épithéliales intestinales, l'effet de la cascade AMPc/PKA sur la différenciation entérocytaire demeurait nébuleuse. Il avait été rapporté que la PKA influençait positivement l'expression du marqueur de différenciation entérocytaire APO A1 (Pignata et al., 1994). Les études avaient été effectuées à l'aide des cellules Caco-2, la lignée parentale des cellules Caco-2/15 utilisées dans nos études, mais seule l'expression de l'ARNm de l'APO A1 après 48h de traitement avec le 8Br-cAMP avait été évaluée comme marqueur de différenciation (Pignata et al., 1994). Un autre groupe de recherche avait, quant à lui, présenté des résultats sur l'effet de la forskoline, un activateur des adénylyl cyclases (Seamon et Daly, 1986), sur la différenciation des cellules Caco-2 et avait obtenu plusieurs résultats similaires aux nôtres : inhibition de l'expression de la sucrase-isomaltase, disparition des espaces intercellulaires et raccourcissements de la longueur des microvillosités (Rousset et al., 1985; Rousset et al., 1989). Cependant, 1- dû à des effets à court terme de la forskoline sur l'expression du marqueur de différenciation dipeptidyl dipeptidase IV qui n'étaient pas mimés par le dibutyryl cAMP, 2- dû à une similarité entre les effets induits par la forskoline et le PMA, 3- et dû à des expériences antérieures qui avaient soulevé des effets indépendants de l'AMPc amenés par la forskoline (Coombs et Thompson, 1987; Hoshi et al., 1988), ils ont par la suite postulé des mécanismes AMPc-indépendants et dépendants de la PKC pour expliquer les

actions de la forskoline sur les cellules Caco-2 (Baricault et al., 1995; Sapin et al., 1997). Dans notre cas, la modulation négative de la différenciation fonctionnelle et morphologique des cellules Caco-2/15 suite à l'activation de la cascade AMPc/PKA a été obtenue en utilisant l'analogue perméable de l'AMPc, le 8Br-cAMP, pour éliminer les possibles effets indépendants de l'AMPc de la forskoline. En accord avec nos résultats, une autre étude a déjà relevé un impact négatif de l'analogue perméable de l'AMPc, le dibutyryl cAMP, sur l'activité du marqueur de différenciation entérocytaire dipeptidyl dipeptidase (Basson et Fu, 1996). Ces résultats, combinés aux nôtres, se réconcilient bien avec une observation faite dans l'intestin grêle de rat où une plus importante activité adénylyl cyclase est retrouvée dans les cellules indifférenciées de la crypte comparativement aux cellules différenciées de la villosité (Quill et Weiser, 1975).

Plusieurs études ont soulevé l'apport considérable des jonctions adhérentes dans la différenciation des cellules épithéliales. Entre autres, dans les cellules MDCK, l'abolition de l'adhésion médiée par la E-cadhérine mène à une dédifférenciation cellulaire (Behrens et al., 1985). Dans les cellules épithéliales intestinales, l'expression d'une forme dominante-négative de la N-cadhérine dans les cellules de la villosité de l'épithélium intestinal chez la souris perturbe la polarité cellulaire visualisée par la perte d'une bordure en brosse apicale et une désorganisation de l'actine (Hermiston et Gordon, 1995a). Plus récemment, il a été rapporté dans les cellules de carcinome de colon humain Caco-2/15, qu'à l'atteinte de la confluence des

cellules, l'assemblage de jonctions adhérentes fonctionnelles assure la stimulation d'une signalisation intracellulaire qui favorise l'activation du facteur de transcription *cdx2* important pour l'expression de marqueurs de différenciation entérocytaire tels que la sucrase-isomaltase (Houde et al., 2001; Laprise et al., 2002). Dans notre étude, nous avons fourni plusieurs évidences suggérant qu'une activation soutenue de la cascade AMPc/PKA inhibe la différenciation entérocytaire en interférant avec l'intégrité des jonctions adhérentes. 1- D'abord, le traitement des cellules Caco-2/15 nouvellement confluentes avec le 8Br-cAMP perturbe la localisation de la E-cadhérine, de la  $\beta$ -caténine, de l' $\alpha$ -caténine et de la F-actine aux sites de contact cellule-cellule (Papier 3, Figures 2A, 2C). 2- Par conséquent, nous avons observé une diminution de l'association des composants de la jonction adhérente (E-cadhérine,  $\beta$ -caténine,  $\alpha$ -caténine) avec le cytosquelette d'actine (Papier 3, Figure 2B), un pré-requis pour la fonctionnalité de la jonction. 3- L'inhibition de la PKA par l'inhibiteur pharmacologique H89 prévient le démantèlement des jonctions adhérentes suite à la chelation du calcium extracellulaire par l'EGTA (Papier 3, Figure 3). 4- De façon intéressante, l'activation soutenue de la cascade AMPc/PKA prévient le recrutement, initié à l'atteinte de la confluence, de la p85/PI3K à la membrane à proximité de la E-cadhérine (Papier 3, Figure 4A), une étape importante pour la différenciation des cellules épithéliales intestinales (Laprise et al., 2002). En effet, il a récemment été montré dans le laboratoire du Dr Rivard qu'à l'atteinte de la confluence des cellules Caco-2/15, il y a recrutement de la

p85/PI3K à la membrane. Cet événement régularise l'association de la E-cadhérine et de la  $\beta$ -caténine avec le cytosquelette d'actine. Cette association fonctionnelle de la jonction favorise par la suite l'activation de la p38 MAPK qui phosphoryle et augmente le pouvoir transcriptionnel du facteur de transcription cdx2. Ce dernier permet, entre autres, l'expression de la sucrase-isomaltase et participe ainsi à la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Pris ensemble, ces résultats suggèrent qu'une forte activité soutenue de la cascade AMPc/PKA à l'atteinte de la confluence des cellules Caco-2/15 inhibe les événements associés à l'assemblage et à la fonctionnalité des jonctions adhérentes bloquant ainsi la signalisation intracellulaire émanant de la jonction adhérente fonctionnelle et, par conséquent, la différenciation entérocytaire des cellules épithéliales intestinales.

Les mécanismes moléculaires empruntés par la cascade AMPc/PKA perturbant l'intégrité des jonctions adhérentes demeurent inconnus. Certaines études indiquent que la cascade AMPc/PKA peut influencer l'organisation du cytosquelette d'actine. Une étude fort intéressante a décrit que l'activation des intégrines par la liaison au collagène I abaisse l'activité de la cascade AMPc/PKA ce qui favorise la polymérisation de l'actine et la différenciation des cellules endothéliales (Whelan et Senger, 2003). De plus, il a déjà été montré que la phosphorylation de l'actine par la PKA inhibe sa polymérisation (Otha et al., 1987). De manière plus indirecte, la PKA semble, dans certains systèmes, être en mesure de phosphoryler et d'inhiber RhoA

(Dong et al., 1998; Ellerbroek et al., 2003), une petite protéine G bien connue pour influencer la polymérisation de l'actine (Kaibuchi et al., 1999). Dernièrement, une étude a mis en lumière la contribution des effecteurs de RhoA dans la régulation des jonctions adhérentes (Sahai et Marshall, 2002). Ils ont montré que l'activation de l'effecteur ROCK détruit l'intégrité des jonctions adhérentes alors que l'effecteur Dia1 assure la polymérisation de l'actine puis la localisation de la E-cadhérine et de l' $\alpha$ -caténine en périphérie de la cellule favorisant ainsi la formation d'une jonction stable. Suite à nos études, nous pouvons exclure la possibilité que l'activation de la cascade AMPc/PKA stimule l'activité de ROCK dans les cellules Caco-2/15 qui contribuerait par la suite à la prévention de l'assemblage des jonctions adhérentes. En effet, le traitement des cellules avec l'inhibiteur pharmacologique de ROCK, le Y27632, ne prévient pas les effets induits par le 8Br-cAMP dans nos cellules Caco-2/15 (résultats non-montrés). Ainsi, nous pouvons également éliminer la probabilité que le H89 agisse en inhibant ROCK puisque le Y27632 ne mime pas les effets du H89. Il avait effectivement été suggéré que le H89 médiait certains de ses effets via l'inhibition de ROCK (Leemhuis et al., 2002). Cependant, nous ne pouvons, pour l'instant, exclure la possibilité que la signalisation activée par le 8Br-cAMP mène à une inhibition de Dia1 qui résulterait en la prévention de l'assemblage des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales intestinales Caco-2/15. Certaines différences peuvent néanmoins être soulevées entre l'effet de l'inhibition de Dia1 (Sahai et Marshall, 2002) et

l'activation de la cascade AMPc/PKA. 1- Alors qu'une certaine proportion de E-cadhérine demeure localisée aux sites de contact cellule-cellule, Sahai et Marshall (2002) notent une importante redistribution de l' $\alpha$ -caténine dans des corps ponctués éloignés des contacts cellule-cellule. Dans notre cas, suite au traitement au 8Br-cAMP, le marquage, en immunofluorescence, de la E-cadhérine,  $\beta$ -caténine et  $\alpha$ -caténine est similaire c'est-à-dire que tous présentent un marquage diffus le long des contacts cellule-cellule (Papier 3, Figure 2A). 2- De plus, ils n'observent aucune influence de l'inhibition de Rho sur l'association des composants de la jonction adhérente avec le cytosquelette d'actine alors qu'il est clair que dans notre cas, le traitement des cellules Caco-2/15 nouvellement confluentes avec le 8Br-cAMP prévient l'association de la E-cadhérine,  $\beta$ -caténine et  $\alpha$ -caténine avec le cytosquelette d'actine (Papier 3, Figure 2C). 3- Finalement, Sahai et Marshall (2002) observent une dissociation de l' $\alpha$ -caténine d'avec le complexe E-cadhérine- $\beta$ -caténine suite à l'inhibition de Rho alors que nos résultats avec le 8Br-cAMP ne montrent, à prime abord, aucune modulation de l'association du complexe E-cadhérine- $\beta$ -caténine- $\alpha$ -caténine (Papier 3, Figure 5D). Malgré ces quelques différences, d'autres expériences seront requises pour dissocier ou attribuer les effets de l'activation de la cascade AMPc/PKA à la signalisation en aval de Rho. Des résultats préliminaires nous indiquent que le traitement des cellules Caco-2/15 avec le CNF, un facteur utilisé pour activer Rho, ne prévient pas la perturbation de l'actine amenée par le traitement au 8Br-

cAMP, suggérant que les effets de la cascade AMPc/PKA sont indépendants de la cascade en aval de Rho.

Les études de Sahai et Marshall (2002) ont montré que la polymérisation de l'actine était nécessaire à l'établissement d'une jonction adhérente fonctionnelle. D'autres publications appuient cette hypothèse (Quinlan and Hyatt, 1999; Vasioukhin et al., 2000). De façon très intéressante, il a été suggéré dans les kératinocytes que l'association de la protéine VASP aux jonctions adhérentes en développement jouait un rôle dans la réorganisation et/ou l'organisation des microfilaments d'actine nécessaire pour l'étanchéité des différents feuilletts épithéliaux (Vasioukhin et al., 2000). De façon encore plus intéressante, la phosphorylation de VASP par la PKA inhibe à la fois sa capacité de liaison à la F-actine et son activité de nucléation de l'actine (Harbeck et al., 2000). De plus, il a été montré que les phosphatidylinositol phosphorylés par la PI3K régularisent positivement les fonctions de VASP (Huttelmaier et al., 1998). Ainsi, on pourrait penser que la phosphorylation de VASP par la PKA et l'absence de produits de la PI3K (due au non-recrutement de la p85/PI3K aux sites de contact cellule-cellule dans les cellules traitées au 8Br-cAMP (Papier 3, Figure 4A)) contribuent à la régulation négative de l'assemblage des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales intestinales présentant une forte activité AMPc/PKA. La localisation de VASP au niveau des membranes des cellules épithéliales de l'intestin de souris (Gambaryan et al., 2001) appuie un rôle possible de VASP dans l'intégrité des jonctions dans les cellules épithéliales



intestinales. Ainsi, je crois qu'il serait intéressant d'étudier l'état de phosphorylation et l'activité de VASP dans les cellules Caco-2/15 traitées avec le 8Br-cAMP. Il existe un anticorps disponible commercialement qui reconnaît spécifiquement la protéine VASP phosphorylée sur la sérine 157, le site majeur de phosphorylation par la PKA (Smolenski et al., 1998).

Une autre avenue intéressante à explorer serait l'effet du traitement des cellules Caco-2/15 avec le 8Br-cAMP sur la fonction de hDlg. Des expériences génétiques récentes ont révélé l'existence d'un groupe de protéines, incluant Bazooka, Discs Lost, Crumbs et Discs Large (Dlg), qui participerait à la polarisation et à la biogenèse des jonctions adhérentes dans les cellules d'origine épithéliale (Gumbiner, 2000; Roh et Margolis, 2003; Tepass, 2002). Des études dans le laboratoire du Dr Rivard ont récemment montré que l'homologue humain de Dlg (hDlg) est localisé au niveau des jonctions adhérentes dans les cellules Caco-2/15. À l'atteinte de la confluence, l'état de phosphorylation de hDlg est modulé ce qui permet le recrutement de la p85/PI3K à la membrane en association avec le complexe jonctionnel et ce recrutement favorise l'assemblage d'une jonction adhérente fonctionnelle (Laprise et al., papier en révision; Laprise et al., 2002). Il serait donc intéressant d'évaluer l'état de phosphorylation de hDlg dans les cellules Caco-2/15 traitées avec le 8Br-cAMP. Une régulation négative de la fonction de hDlg par la cascade AMPc/PKA pourrait expliquer 1- l'absence de recrutement de la p85/PI3K à la membrane après l'atteinte de la confluence dans les cellules traitées avec le 8Br-cAMP (Papier 3, Figure 4A), 2- et

l'impact négatif de la cascade AMPc/PKA sur l'intégrité des jonctions adhérentes et la différenciation entérocytaire (Papier 3, Figures 1,2).

Les voies de signalisation qui influencent l'activité adhésive des jonctions adhérentes demeurent très peu connues. Mis à part la signalisation en aval des petites protéines G Rac, Rho et Cdc42 (Braga et al., 1997; Hordjik et al., 1997; Kodama et al., 1999; Takaishi et al., 1997), il a récemment été montré que l'activation de la cascade MEK/ERK pouvait moduler négativement l'adhésion dépendante des cadhérines (Barbosa et al., 2003). En effet, cette étude propose que la stimulation des cellules Caco-2 avec le phorbol ester TPA augmente l'activité de la PKC puis des ERK1/2 qui sont responsables du démantèlement des jonctions adhérentes. Comme la cascade AMPc/PKA a déjà été rapportée pour stimuler la cascade MEK/ERK (Stork et Schmitt, 2002) et puisque la signalisation de la PKA peut interagir avec la signalisation de la PKC (Robinson-White et Stratakis, 2002), nous avons voulu dissocier les effets du 8Br-cAMP de la cascade MEK/ERK et de la PKC. Dans notre système, les effets du 8Br-cAMP ne peuvent être attribués à une stimulation de la cascade MEK/ERK ou des PKC conventionnelles puisque 1- les inhibiteurs de MEK, le PD98059 et UO126 et l'inhibiteur des PKC conventionnelles, le Gö6976, ne bloquent pas les effets induits par le 8Br-cAMP (résultats non- montrés), 2- ces inhibiteurs ne miment pas l'effet du H89 c'est-à-dire qu'ils ne préviennent pas le démantèlement des jonctions lorsque les cellules sont incubées avec le chelateur de calcium extracellulaire EGTA (résultats non-montrés), 3- et contrairement au TPA qui

diminue l'expression de la E-cadhérine (Barbosa et al., 2003), le 8Br-cAMP n'influence pas l'expression totale de la E-cadhérine et des caténines (Papier 3, Figure 2B).

Une observation intéressante dans nos études est la phosphorylation sur résidu sérine de la E-cadhérine par un mécanisme dépendant de l'activité de la PKA. La phosphorylation sur résidu tyrosine des complexes cadhérine-caténine est connue pour inhiber l'activité adhésive des jonctions adhérentes (Daniel et Reynolds, 1997). Cependant peu d'études ont relevé une phosphorylation sur résidu sérine de la E-cadhérine. Une seule publication a montré que la E-cadhérine pouvait être phosphorylée sur résidu sérine par la caséine kinase II (Serres et al., 2000). Les résultats qu'ils ont obtenus leur ont permis de suggérer que la phosphorylation dans le domaine de liaison à la  $\beta$ -caténine de la E-cadhérine par la caséine kinase II était nécessaire à l'interaction E-cadhérine/ $\beta$ -caténine. Cette hypothèse était appuyée par une autre étude qui avait démontré que la mutation de 8 résidus sérine dans la région de 30 acides aminés de la E-cadhérine nécessaire pour l'interaction avec la  $\beta$ -caténine induisait une perte d'adhésion cellule-cellule (Stappert et Kemler, 1994). Nos études suggèrent que la E-cadhérine peut également être phosphorylée sur résidu sérine, mais par un mécanisme dépendant de l'activité de la PKA dans les cellules traitées au 8Br-cAMP (Papier 3, Figure 5). La poursuite de ce projet de recherche nécessitera l'identification des sites de phosphorylation de la E-cadhérine par la PKA. Ainsi, les sites de phosphorylation par la PKA et la caséine kinase II semblent être distincts et la

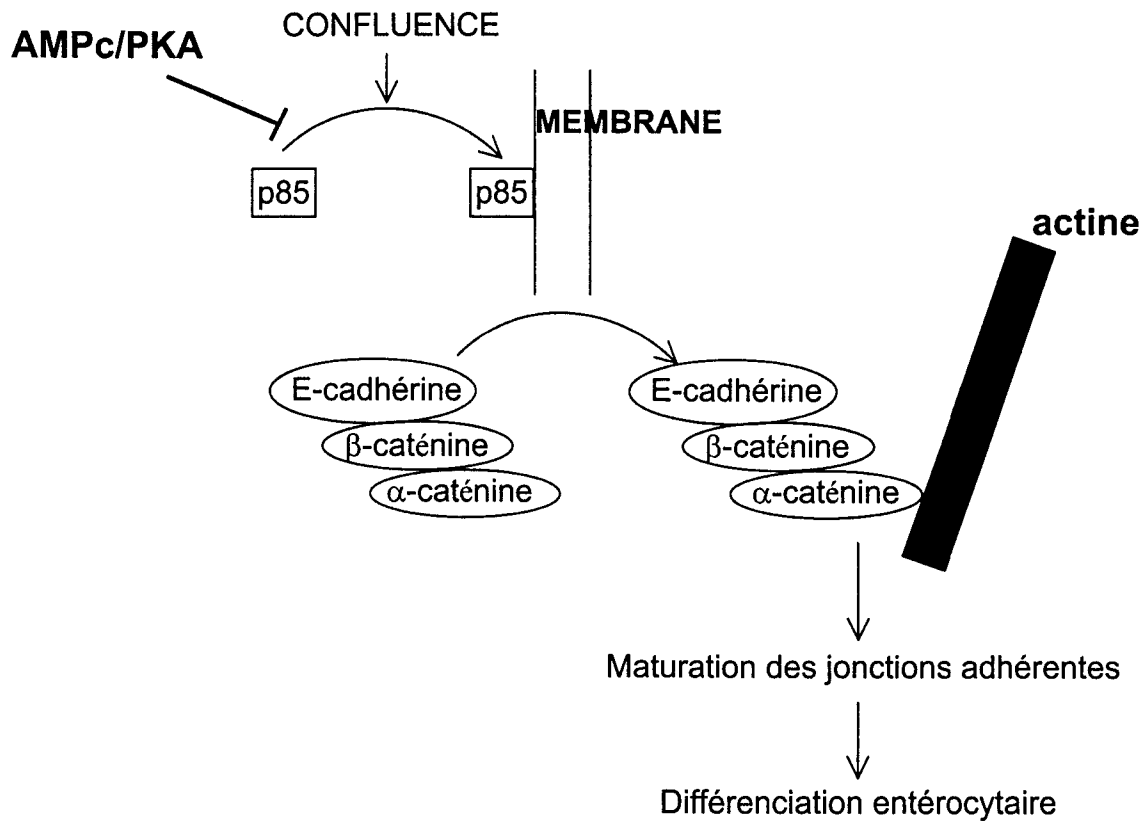
phosphorylation de la E-cadhérine par ces kinases semblent avoir des conséquences différentes sur l'intégrité de la jonction adhérente. Alors qu'une phosphorylation par la caséine kinase II semble favoriser l'assemblage de la jonction, une phosphorylation sur résidu sérine de la E-cadhérine par la PKA semble plutôt associée à une jonction non-fonctionnelle. Cependant, d'autres études seront nécessaires pour expliquer comment une phosphorylation de la E-cadhérine par la PKA module l'activité adhésive de la jonction adhérente. Nos premiers résultats nous indiquent que la phosphorylation de la E-cadhérine par la PKA n'a pas de conséquence sur l'interaction de la E-cadhérine avec son partenaire direct  $\beta$ -caténine et indirect  $\alpha$ -caténine (Papier 3, Figure 5E). Cependant, sans moduler l'interaction avec les caténines, la phosphorylation de la E-cadhérine pourrait peut-être prévenir son association avec d'autres protéines nécessaires à l'établissement d'une jonction adhérente fonctionnelle. Comme indiqué à la figure 3 de l'introduction de cette thèse, une jonction adhérente fonctionnelle implique la participation de plusieurs protéines. En plus de ceux identifiés à la figure 3, il semble que de nouveaux joueurs vont s'ajouter à ce complexe multiprotéique de la jonction adhérente fonctionnelle comme par exemple la hDlg.

Notre étude est la première à décrire un impact négatif de la cascade AMPc/PKA sur l'intégrité des jonctions adhérentes des cellules épithéliales. Cependant, quelques autres études ont corrélié une activité de la cascade AMPc/PKA avec le démantèlement des jonctions serrées. En effet, une phosphorylation de la ZO-2 dépendante de la PKA a été décelée dans les

cellules MDCK traitées avec l'EGTA (donc dans des cellules où les jonctions sont démantelées) suggérant que la phosphorylation sur résidu sérine de la ZO-2 par la PKA pouvait affecter son habileté d'opérer adéquatement dans le complexe jonctionnel (Avila-Flores et al., 2001). Dans les cellules épithéliales EpH4, des inhibiteurs de la PKA préviennent la perte d'association à la membrane de l'occludine, de la ZO-1 et de la ZO-2 induite par de faibles concentrations extracellulaires de calcium (Klinger et al., 2000), un résultat comparable aux nôtres où le H89 prévient la re-localisation de la E-cadhérine lors d'un traitement avec l'EGTA (Papier 3, Figure 3). Il a également été montré que l'expression d'une protéine  $G\alpha_{12}$  favorisait la biogenèse et le maintien des jonctions serrées dans les cellules d'origine épithéliale (Saha et al., 1998).

En résumé, nos résultats suggèrent que l'activation inappropriée de la cascade AMPc/PKA influence négativement la différenciation fonctionnelle et morphologique des cellules épithéliales intestinales (voir figure 10). Nos résultats pourraient s'avérer fort intéressant physiologiquement puisqu'une augmentation de la concentration de prostaglandine E2, un agent physiologique qui augmente les concentrations intracellulaires d'AMPc, a été observée dans les tissus de carcinome de colon (Levy, 1997). Récemment, il a été montré chez le rat que la prostaglandine E2 amplifiait la carcinogénèse du colon induite par l'azoxyméthane (Kawamori et al., 2003). De plus, il a été noté que les signaux induits par la prostaglandine E2 et l'AMPc accélèrent

la formation de polypes intestinaux dans les souris knockout APC(delta716) (Sonoshita et al., 2001).



**FIGURE 10. MODÈLE PROPOSÉ EXPLIQUANT L'IMPACT NÉGATIF DE LA CASCADE AMPc/PKA SUR LA DIFFÉRENCIATION ENTÉROCYTAIRE.**

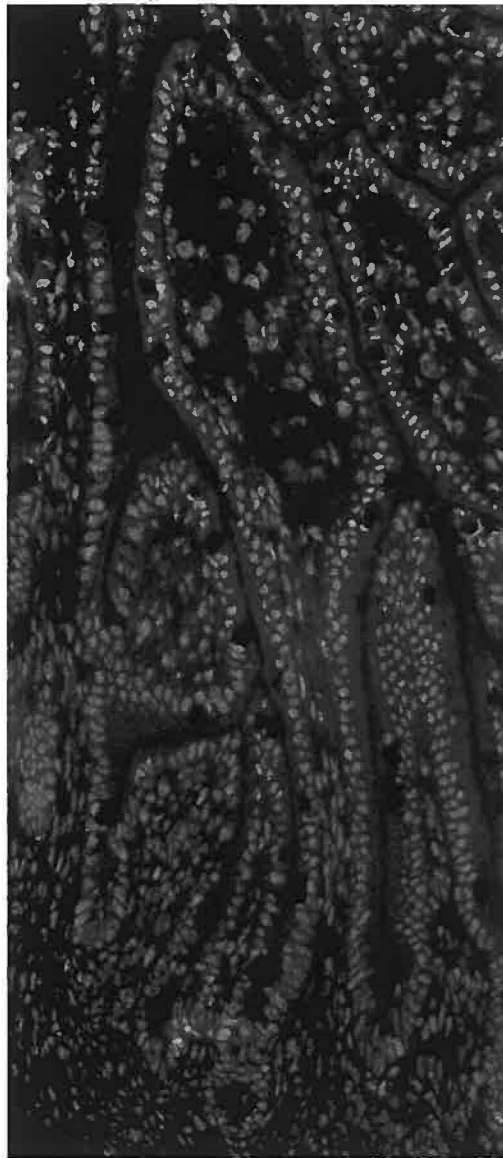
Le modèle précédemment proposé par Laprise et al.(2002) suggérait qu'à l'atteinte de la confluence des cellules Caco-2/15, il y a recrutement de la p85/PI3K à la membrane ce qui permet l'assemblage des protéines des jonctions adhérentes, E-cadhérine,  $\alpha$ -caténine et  $\beta$ -caténine, avec le cytosquelette d'actine. Cette assemblage assure par la suite la maturation des jonctions adhérentes, une étape essentielle à l'induction de la différenciation entérocytaire. Les résultats présentés dans le cadre de cette thèse suggèrent qu'une forte activité de la cascade AMPc/PKA inhibe le recrutement de la p85/PI3K à la membrane ce qui bloque l'association des composants de la jonction avec le cytosquelette d'actine et, par conséquent, inhibe la différenciation épithéliale intestinale.

#### **4. CONCLUSION GÉNÉRALE**

Les résultats issus de mes travaux de doctorat m'auront permis d'entrevoir la complexité des mécanismes cellulaires et moléculaires qui régularisent les processus de prolifération et de différenciation des cellules épithéliales intestinales. Ces processus nécessitent une balance et une coordination adéquates de plusieurs voies de signalisation afin de maintenir l'homéostasie tissulaire de l'épithélium intestinal. En effet, j'ai pu constater qu'une dérégulation de la cascade MEK/ERK ou de la cascade AMPc/PKA peut avoir des conséquences graves sur les processus de prolifération et de différenciation des cellules épithéliales intestinales. Cependant, finement contrôlée, la cascade MEK/ERK, contribue au bon fonctionnement des processus de prolifération et différenciation des cellules épithéliales intestinales.

Je crois que mes recherches de doctorat auront soulevé autant de questions qu'apporté de réponses. Ainsi, je ne peux que souhaiter que les portes que j'ai ouvertes avec mes travaux soient éventuellement refermées par mes successeurs.



**ANNEXE 1**

**FIGURE 1.** Expression de l'inhibiteur p16<sup>INK4A</sup> dans l'épithélium intestinal de fœtus humain

---

## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, Dr Josette Noël, Dr Nicole Gallo-Payet et Dr Claude Asselin d'avoir accepté de corriger ma thèse à un rythme accélérée.

Je tiens à remercier les membres passés et présents du laboratoire, plus spécialement Claude, Patrick, Cathia, Marie-Ève, Jim, Mélanie, sans oublier Laetitia, avec qui j'ai partagé plusieurs de mes aventures au cours des dernières années.

Je tiens également à souligner l'apport technique de Denis Martel et notamment de Pierre Magny avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à discuter.

Je ne voudrais pas passer sous silence la contribution de Pierre Pothier dans l'aboutissement de mon doctorat ; autant dans la résolution de problèmes divers que dans la critique scientifique des articles issus de mes travaux. De plus, je tiens à le remercier pour son inépuisable disponibilité.

Je tiens également à remercier deux personnes qui, sans directement être impliquées dans mes études doctorales, sont présentes depuis le tout début de mes études graduées : Jean Lainé et le Dr Jean Morisset. Je vous remercie d'avoir persisté vos encouragements durant toutes ces années.

Les mots me manquent pour remercier Anne Vézina. Sans elle, je serais encore à la pailasse aujourd'hui. Je la remercie donc pour tout, spécialement cette dernière année où j'ai pratiquement abusé d'elle.

Les mots me manquent encore plus pour remercier ma directrice de thèse, Dr Nathalie Rivard. Je te remercie pour ta vivacité d'esprit, ta rigueur

---

scientifique et ta passion sans borne pour la science ; cela a su me motiver au cours des années. Je souhaiterais que tous les chercheurs scientifiques soient comme toi. Je te remercie également de m'avoir « gâté » au cours de ces années de doctorat ; les nombreux congrès scientifiques auxquels j'ai assistés ont toujours été une source incroyable de motivation. Également, je tiens à te remercier pour ton statut de psychologue. Tu as toujours su trouver les mots pour m'aider à continuer même pendant mes moments plus difficiles, dont certains épisodes que je ne tiens pas à me rappeler.

Finalement, je remercie mon cœur, Mathieu, qui a toujours été présent pour me changer les idées bon jours, mauvais jours. Je le remercie également de sa patience. Tout simplement, je le remercie de partager ma vie.

---

## RÉFÉRENCES

- Abbott, D.W., et Holt, J.T. (1999) Mitogen-activated protein kinase kinase 2 activation is essential for progression through the G2/M checkpoint arrest in cells exposed to ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* **274**: 2732-2742.
- Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A., et Pestell, R.G. (1995) Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promotor through distinguishable regions. *J. Biol. Chem.* **270**: 23589-23597.
- Alcorta, D.A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., et Barrett, J.C. (1996) Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** : 13742-13747.
- Alessandrini, A., Chiaur, D.S., et Pagano, M. (1997) Regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 by degradation and phosphorylation. *Leukemia* **11** : 342-345.
- Aliaga, J.C., Deschênes, C., Beaulieu, J.-F., Calvo, E.L., et Rivard, N. (1999) Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **277**: G631-G641.
- Aono, S., Nakagawa, S., Reynolds, A.B., et Takeichi, M. (1999) p120(ctn) acts as an inhibitory regulator of cadherin function in colon carcinoma cells. *J. Cell Biol.* **145**: 551-562.
- Atadja, P., Wong, H., Garkavtsev, I., Veillette, C., et Riabowol, K. (1995) Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8348-8352.
- Avila-Flores, A., Rendon-Huerta, E., Moreno, J., Islas, S., Betanzos, Robles-Flores, M., and Gonzalez-Mariscal, L. (2001) Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosphorylation by protein kinase C. *Biochem. J.* **360**: 295-304.
- Babyatsky, M.W., et Podolsky, D.K. (1999) Growth and Development of the Gastrointestinal Tract. Dans *Textbook of gastroenterology*. (Yamada, T., ed) 3<sup>rd</sup> Ed., pp.547-584, J.B. Lippincott Co., Philadelphia
- Balda, M.S., et Matter, K. (1998) Tight junctions. *J. Cell Sci.* **111**: 541-547.

---

Balmano, K., et Cook, S.J. (1999) Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells. *Oncogene* **18**: 3085-3097.

Barbosa, L.A., Goto-Silva, L., Redondo, P.A., Oliveira, S., Montesano, G., de Souza, W., Morgado-Díaz, J.A. (2003) TPA-induced signal transduction: a link between PKC and EGFR signalling modulates the assembly of intercellular junctions in Caco-2 cells. *Cell Tissue Res.* **312**:319-31.

Bardwell, L., et Thorner, J. (1996) A conserved motif at the amino termini of MEKs might mediate high-affinity interaction with the cognate MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 373-374.

Baricault, L., Fransen, J.A.M., Garcia, M., Sapin, C., Codogno, P., Ginsel, L.A., and Trugnan, G. (1995) Rapid sequestration of DPP IV/CD26 and other cell surface proteins in an autophagic-like compartment in Caco-2 cells treated with forskolin. *J. Cell Sci.* **108** : 2109-2121.

Basson, M.D., Fu, H. (1996) Regulation of human Caco-2 intestinal epithelial brush border enzyme activity by cyclic nucleotides. *Cancer Lett.* **99**:155-160.

Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L., et Vousden, K.H. (1998) p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* **395**: 124-125.

Beaulieu, J.-F. (1997) Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog. Histochem. Cytochem.* **31**: 1-78.

Behrens, J., Birchmeier, W., Goodman, S.L., et Imhof, B.A. (1985) Dissociation of Madin-Darby canine kidney epithelial cells by the monoclonal antibody anti-arc-1: mechanistic aspects and identification of the antigen as a component related to uvorulin. *J. Cell. Biol.* **101**: 1307-1315.

Bienz, M., et Clevers, H. (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* **103**: 311-320.

Birchmeier, W., et Behrens, J. (1994) Cadherin expression in carcinomas: role in the formation and the prevention of invasiveness. *Biochim. Biophys. Acta* **1198**: 11-26.

Blenis, J. (1993) Signal transduction via the MAP kinases : proceed at your own RSK. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, **90**, 5889-5892.

---

Bond, J., Haughton, M., Blaydes, J., Gire, V., Wynford-Thomas, D., et Wyllie, F. (1996) Evidence that transcriptional activation by p53 plays a direct role in the induction of senescence. *Oncogene* **13**: 2097-2104.

Bos JL. (1988) The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat. Res.* **195**:255-271.

Bottazzi, M.E., Zhu, X., Bohmer, R.M., et Assoian, R.K. (1999) Regulation of p21(cip1) expression by growth factors and the extracellular matrix reveals a role for transient ERK activity in G1 phase. *J. Cell. Biol.* **146**: 1255-1264.

Boudreau, F., Zannoni, S., Pelletier, N., Bardati, T., Yu, S.J., et Asselin, C. (1999) Negative regulation of glucocorticoid-dependent induction of c-fos by ras in intestinal epithelial cells. *Mol. Cell. Biochem.* **195**: 99-111.

Braga, V.M., Machesky, L.M., Hall, A., and Hotchin, N.A. (1997) The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J. Cell Biol.* **137**: 1421-1431.

Bradley, R.S., Cowin, P., et Brown, A.M.C. (1993) Expression of wnt-1 in PC12 cells results in modulation of plakoglobin and E-cadherin and increased cellular adhesion. *J. Cell Biol.* **123**: 1857-1865.

Brady-Kalnay, S.M., Rimm, D.L., et Tonks, N.K. (1995) Receptor protein tyrosine phosphatase PTPm associated with cadherins and catenins in vivo. *J. Cell Biol.* **130**: 977-986.

Brunet, A., Pagès, G., et Pouyssegur, J. (1994a) Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1). *FEBS Lett.* **346**:299-303.

Brunet, A., Pagès, G., et Pouyssegur, J. (1994b) Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts. *Oncogene* **9**:3379-3387.

Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S., et Pouyssegur, J. (1999) Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J.* **18**: 664-674.

Campbell, D.H., Sutherland, R.L., and Daly, R.J. (1999) Signaling pathways and structural domains required for phosphorylation of EMS1/Cortactin. *Cancer Res.* **59**: 5376-5385.

---

Canagarajah, B.J., Khokhlatchev, A., Cobb, M.H., et Goldsmith, E.J. (1997) Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**: 859-869.

Carraway, C.A.C., Carvajal, M.E., et Carraway, K.L. (1999) Association of the Ras to mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway with microfilaments. *J. Biol. Chem.* **274**: 25659-25667.

Carroll, M.P. et May, W.S. (1994) Protein kinase C-mediated serine phosphorylation directly activates Raf-1 in murine hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 1249-1256.

Che, Y.-H., Lu, Q., Schneeberger, E.E., and Goodenough, D.A. (2000) Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in Ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell* **11**: 849-862.

Chen, X., Zhang, W., Gao, Y.F., Su, X.Q., et Zhai, Z.H. (2002) Senescent-like changes induced by expression of p21(waf1/Cip1) in NIH3T3 cell line. *Cell Res.* **12**: 229-233.

Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J.A., Fero, M., Rousse., M.F., Roberts, J.M., et Sherr, C.J. (1999) The p21<sup>Cip1</sup> and p27<sup>Kip1</sup> CDK "inhibitors" are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo J.* **18**: 1571-1583.

Cheresh, D.A., Leng, J., and Klemke, R.L. (1999) Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells. *J. Cell Biol.* **146**: 1107-1116.

Cherniack, A.D., Klarlund, J.K., et Czech, M.P. (1994) Phosphorylation of the Ras nucleotide exchange factor son of sevenless by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **269**: 4717-4720.

Cherniack, A.D., Klarlund, J.K., Conway, B.R. et Czech, M.P. (1995) Disassembly of son-of-sevenless proteins from Grb2 during p21<sup>ras</sup> desensitization by insulin. *J. Biol. Chem.* **270**: 4717-4720.

Childs, T.J., Watson, M.H., Sanghera, J.S., Campbell, D.L., Pelech, S.L., et Mak, A.S. (1992) Phosphorylation of smooth muscle caldesmon by mitogen-activated protein (MAP) kinase and expression of MAP kinase in differentiated smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **267**: 22853-22859.

Childs, T.J., et Mak, A.S. (1993) Smooth-muscle mitogen-activated protein (MAP) kinase: purification and characterization and the phosphorylation of caldesmon. *Biochem. J.* **296**: 745-751.

---

Chiu, T., Santiskulvong, C., et Rozengurt, E. (2003) ANG II stimulates PKC-dependent ERK activation, DNA synthesis, and cell division in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **285**: G1-G11.

Chiu, T., Wu, S.S., Santiskulvong, C., Tangkijvanich, P., Yee, H.R. Jr., et Rozengurt, E. (2002) Vasopressin-mediated mitogenic signaling in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **282**: C434-C450.

Chung, B.M., Wong, J.K., Hardin, J.A., and Gall, D.G. (1999) Role of actin in EGF-induced alterations in enterocyte SGLT1 expression. *Am. J. Physiol.* **276**: G463-G469.

Connell-Crowley, L., Harper, J.W., et Goodrich, D.W. (1997) CyclinD1/cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 287-301.

Coombs, J., and Thompson, S. (1987) Forskolin's effect on transient K current in nudibranch neurons is not reproduced by cAMP. *J. Neurosci.* **7**: 443-452.

Cook, S.J., et McCormick, F. (1996) Kinetic and biochemical correlation between p44ERK1(44kDa extracellular signal-regulated kinase 1) activation and lysophosphatidic acid-stimulated DNA synthesis in Rat-1 cells. *Biochem J.* **320**: 237-245.

Danen, E.H., Sonneveld, P., Sonnenberg, A., et Yamada, K.M. (2000) Dual stimulation of Ras/mitogen-activated protein kinase and RhoA by cell adhesion to fibronectin supports growth factor-stimulated cell cycle progression. *J. Cell. Biol.* **151**: 1413-1422.

D'Angelo, G., Graceffa, P., Albert Wang, C.-L., Wrangle, J., et Adam, L.P. (1999) Mammal-specific, ERK-dependent, caldesmon phosphorylation in smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **274**: 30115-30121.

Daniel, J.M., et Reynolds, A.B. (1997) Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function. *Bioessays* **19**: 883-891.

DeGregori, J., Kowalik, T., et Nevins, J.R. (1995) Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol. Cell. Biol.* **15**:4215-4224.

DePinho, R.A. (2000) The age of cancer. *Nature* **408**: 248-254.

Deschênes, C., Vézina, A., Beaulieu, J.F., et Rivard, N. (2001) Role of p27<sup>Kip1</sup> in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* **120**: 423-438.



---

De Stanchina, E., McCurrach, M.E., Zindy, F., Shieh, S.-Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A.V., Prives, C., Roussel, M.F., Sherr, C.J., et Lowe, S.W. (1998) E1A signaling to p53 involves the p19<sup>ARF</sup> tumor suppressor. *Genes Dev.* **12**: 2434-2442.

Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., et Leder, P. (1995) Mice lacking p21<sup>CIP1/WAF1</sup> undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82** : 675-684.

DeRoosij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A., et Bos, J.L. (1998) Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **396**: 474-477.

DiFrancesco, D., et Tortora, P. (1991) Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclin AMP. *Nature* **351**: 145-147.

Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., et Wahl, G.M. (1994) DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* **8**: 2540-2551.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., et Pereira-Smith, O. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:9363-9367.

Ding, Q., Wang, Q., et Evers, B.M. (2001) Alterations of MAPK activities associated with intestinal cell differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **284**: 282-288.

Dong, J.M., Leung ,T., Manser, E., and Lim, L. (1998) cAMP-induced morphological changes are counteracted by the activated RhoA small GTPase and the Rho kinase ROKalpha. *J. Biol. Chem.* **273**: 22554-22562.

Dorudi, S., Hanby, A.M., Poulson, R., Northover, J., et Hart, I.R. (1995) Level of expression of E-cadherin mRNA in colorectal cancer correlates with clinical outcome. *Br. J. Cancer* **71**: 614-616.

Drucker, D.J. (1997) Epithelial cell growth and differentiation. I. Intestinal growth factors. *Am. J. Physiol.* **273**: G3-G6.

Dufour, S., Saint-Jeannet, J.-P., Broders, F., Wedlich, D., et Thiery, J.P. (1994) Differential perturbations in the morphogenesis of anterior structures induced by overexpression of truncated XB- and N-cadherins in *Xenopus* embryos. *J. Cell. Biol.* **127**: 521-535.

---

Duncan, R., Milburn, S.C., et Hershey, J.W. (1987) Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *J. Biol. Chem.* **262**: 380-388.

Duprey, P., Chowdhury, K., Dressler, G.R., Balling, R., Simon, D., Guenet, J.-L., et Gruss, P. (1988) A mouse gene homologous to the *Drosophila* gene *caudal* is expressed in epithelial cells from the embryonic intestine. *Genes Dev.* **2**: 1647-1654.

Efstathiou, J.A., Liu, D., Wheeler, J.M.D., Kim, H.C., Beck, N.E., Ilyas, M., Karayiannakis, A.J., Mortensen, N.J.McC, Kmiot, W., Playford, R.J., Pignatelli, M., et Bodmer, W.F. (1999) Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 2316-2321.

El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, E., Kinzler, K.W., et Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75** : 817-825.

Ellerbroek, S.M., Wennerberg, K., et Burridge, K. (2003) Serine phosphorylation negatively regulates RhoA *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **278**: 19023-19031.

Esteller, M., Tortola, S., Toyota, M., Capella, G., Peinado, M.A., Baylin, S.B., et Herman, J.G. (2000) Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res.* **60**: 129-133.

Evers, B.M., Ko, T.C., Li, J., et Thompson, E.A.(1996) Cell cycle protein suppression and p21 induction in differentiating Caco-2 cells. *Am. J. Physiol.* **271**: G722-G727.

Fang, R., Santiago, N.A., Olds, L.C., et Sibley, E. (2000) The homeodomain protein Cdk2 regulates lactase gene promote activity during enterocyte differentiation. *Gastroenterology* **118** : 115-127.

Fath, K.R., Mamajiwalla, S.N., et Burgess, D.R. (1993) The cytoskeleton in development of epithelial cell polarity. *J. Cell Sci.* **S17**: 65-73.

Fearon, E.R., et Vogelstein, B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**:759-767.

---

Fero, M.L., Rivkin, M., Tash, M., Porter, P., Carow, C.E. (1996) A syndrome of multiple organ hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27<sup>Kip1</sup>-deficient mice. *Cell* **85**: 733-744.

Flynn, A., et Proud, C.G. (1995) Ser209, but not ser53, is the major site of phosphorylation in initiation factor eIF4E in serum-treated Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 21684-21688.

Fodde, R., Smits, R., et Clevers, H. (2001) APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* **1**: 55-67.

Formstecher, E., Ramos, J.W., Fauquet, M., Calderwood, D.A., Hsieh, J.C., Canton, B., Nguyen, X.T., Barnier, J.V., Camonis, J., Ginsberg, M.H., et Chneiweiss, H. (2001) PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Dev. Cell* **1**: 239-250.

Forrester, K., Almoguera, C., Han, K., Grizzle, W.E., et Perucho, M. (1987) Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature (Lond.)* **327**: 298-303.

Franklin, D.S., et Xiong, Y. (1996) Induction of p18INK4c and its predominant association with CDK4 and CDK6 during myogenic differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 1587-1599.

Fukuda, M., Gotoh, I., Adachi, M., Gotoh, Y., et Nishida, E. (1997) A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. *J. Biol. Chem.* **272**: 32642-32648.

Fukunaga, R., et Hunter, T. (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J.* **16**: 1921-1933.

Gambaryan, S., Hauser, W., Kobsar, A., Glazova, M., et Walter, U. (2001) Distribution, cellular localization, and postnatal development of VASP and Mena expression in mouse tissues. *Histochem. Cell Biol.* **116**: 535-543.

Garabedian, E.M., Roberts, L.J.J., McNevin, M.S., et Gordon, J.I. (1997) Examining the role of Paneth in the small intestine by lineage ablation in transgenic mouse. *J. Biol. Chem.* **272**: 23729-23740.

Gartel, A.L., Serfas, M.S., Gartel, M., Goufman, E., Wu, G.S., El-Deiry, W.S., et Tyner, A.L. (1996) p21 (WAF1/CIP1) expression is induced in newly non-dividing cells in diverse epithelia and during differentiation of the Caco-2 intestinal cell line. *Exp. Cell Res.* **227**: 171-181.

---

Gauss, R., Seifert, R., et Kaupp, U.P. (1998) Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* **393**: 583-587.

Gire, V., et Wynford-Thomas, D. (1998) Reinitiation of DNA synthesis and cell division in senescent human fibroblasts by microinjection of anti-p53 antibodies. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 1611-1621.

Gire, V., Marshall, C.J., et Wynford-Thomas, D. (1999) Activation of mitogen-activated protein kinases is necessary but not sufficient for proliferation of human thyroid epithelial cells induced by mutant Ras. *Oncogene* **18**: 4819-4832.

Gire, V., et Wynford-Thomas, D. (1999) La sénescence dans les cellules humaines: un obstacle au développement tumoral? *Méd. Sci.* **15** : 1096-1104.

Gire, V., Marshall, C.J., et Wynford-Thomas, D. (2000) PI-3-kinase is an essential anti-apoptotic effector in the proliferative response of primary human epithelial cells to mutant Ras. *Oncogene* **19**: 2269-2276.

Go, V.L.M., Gardner, J.D., Brooks, F.P., Lebenthal, E., DiMagno, E.P., et Scheele, G.A. (1986) The exocrine pancreas: biology, pathobiology and diseases. Raven Press, New York.

Goda, T., et Takase, S. (1994) Effect of dietary fat content on microvillus in rat jejunum. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. Tokyo* **40** : 127-136.

Göke, M., Kanai, M., Lynch-Devaney, K., et Podolsky, D.K. (1998) Rapid mitogen-activated protein kinase activation by transforming growth factor  $\alpha$  in wounded rat intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **114**: 697-705.

Gopalbhai, K., Jansen, G., Beauregard, G., Whiteway, M., Dumas, F., Wu, C., et Meloche, S. (2003) Negative regulation of MAPKK by phosphorylation of a conserved serine residue equivalent to Ser212 of MEK1. *J. Biol. Chem.* **278**: 8118-8125.

Gopalbhai, K., et Meloche, S. (1998) Repression of mitogen-activated protein kinases ERK1/ERK2 activity by a protein tyrosine phosphatase in rat fibroblasts transformed by upstream oncoproteins. *J. Cell. Physiol.* **174**:35-47.

Goyal, R.K., Lin, P., Kanungo, J., Payne, A.S., Muslin, A.J., et Longmore, G.D. (1999) Ajuba, a novel LIM protein, interacts with Grb2, augments mitogen-activated protein kinase activity in fibroblasts, and promotes meiotic maturation of *Xenopus* oocytes in a Grb2- and Ras-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 4379-4389.

---

Grana, X., Garriga, J., et Mayol, X. (1998) Role of the retinoblastoma protein family, pRb, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene* **17** : 3365-3383.

Greulich, H., Reichman, C., et Hanafusa, H. (1996) Delay in serum stimulation of Erk activity caused by oncogenic transformation. *Oncogene* **12**: 1689-1695.

Greulich, H., et Erikson, R.L. (1998) An analysis of Mek1 signaling in cell proliferation and transformation. *J. Biol. Chem.* **273**: 13280-13288.

Groth, A., Weber, J.D., Willumsen, B.M., Sherr, C.J., et Roussel, M.F. (2000) Oncogenic Ras induces p19<sup>ARF</sup> and growth arrest in mouse embryo fibroblasts lacking p21<sup>Cip1</sup> and p27<sup>Kip1</sup> without activating cyclin D-dependent kinases. *J. Biol. Chem.* **275**: 27473-27480.

Guan, R.J., Fu, Y., Holt, P.R., et Pardee, A.B. (1999) Association of K-ras mutations with p16 methylation in human colon cancer. *Gastroenterology* **116**: 1063-1071.

Gumbiner, B., et Simons, K. (1986) A functional assay for proteins involved in establishing an epithelial occluding barrier : identification of a uvorulin-like peptide. *J. Cell. Biol.* **102**: 457-468.

Gumbiner, B.M. (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**: 345-357.

Gumbiner, B.M. (2000) Regulation of cadherin adhesive activity. *J. Cell Biol.* **148**: 399-403.

Gupta, I.R., Piscione, T.D., Grisaru, S., Phan, T., Macias-Silva, M., Zhou, X., Whiteside, C., Wrana, J.L., and Rosenblum, N.D. (1999) Protein kinase A is a negative regulator of renal branching morphogenesis and modulates inhibitory and stimulatory bone morphogenetic proteins. *J. Biol. Chem.* **274**: 26305-26314.

Hafner, S., Adler, H.S., Mischak, H., Janosch, P., Heidecker, G., Wolfman, A., Pippig, S., Lohse, M., Ueffing, M., et Kolch, W. (1994) Mechanism of inhibition of Raf-1 by protein kinase A. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 6696-6703.

Hagemann, C., et Rapp, U.R. (1999) Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp. Cell Res.* **253**: 34-46.

Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**: 509-514.

---

Hamilton, M., et Wolfman, A. (1998) Ha-ras and N-ras regulate MAPK activity by distinct mechanisms in vivo. *Oncogene* **16** : 1417-1428.

Han, Z., Wei, W., Dunaway, S., Darnowski, J.W., Calabresi, P., Sevidy, J., Hendrickson, E.A., Balan, K.V., Pantazis, P., et Wyche, J.H. (2002) Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *J. Biol. Chem.* **277**: 17154-17160.

Hannon, G.J., et Beach, D. (1994) p15<sup>INK4B</sup> is a potential effector of cell cycle arrest mediated by TGF- $\beta$ . *Nature* **371** : 257-261.

Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S., et Peters, G. (1996) Regulation of p16<sup>CDKN2</sup> expression and its implication for cell immortalization and senescence. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 859-867.

Harbeck, B., Huttelmaier, S., Schluter, K., Jockusch, B.M., et Illenberger, S. (2000) Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J. Biol. Chem.* **275**: 30817-30825.

Hardin, J.A., Buret, A., Meddings, J.B., et Gall, D.G. (1993) Effect of epidermal growth factor on enterocyte brush-border surface area. *Am. J. Physiol.* **264**: G312-G318.

Harvey, D.M., et Levine, A.J. (1991) p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev.* **5**: 2357-2385.

Harvey, M., Sands, A.T., Weiss, R.S., Hegi, M.E., Wiseman, R.W., Pantazis, P., Giovanella, B.C., Tainsky, M.A., Bradley, A., et Donehower, L.A. (1993) In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. *Oncogene* **8**: 2457-2467.

Hermiston, M.L., et Gordon, J.I. (1995a) In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *J. Cell. Biol.* **129**: 489-506.

Hermiston, M.L., et Gordon, J.I. (1995b) Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant-negative N-cadherin. *Science* **270**: 1203-1207.

Hermiston, M.L., Wong, M.H., et Gordon, J.I. (1996) Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system. *Genes Dev.* **10**: 985-996.

---

Hinck, L., Nelson, W.J., et Papkoff, J. (1994) Wnt-1 modulates cell-cell adhesion in mammalian cells by stabilizing  $\beta$ -catenin binding to the cell adhesion protein cadherin. *J. Cell Biol.* **124**: 729-741.

Hirai, H., Roussel, M.F., Kato, J.-Y., Ashmun, R.A., et Sherr, C.J. (1995) Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 2672-2681.

Holmes, R., and Lobley, R.W. (1989) Intestinal brush border revisited. *Gut* **30**: 1667-1678.

Holt, K.H., Kasson, B.G., et Pessin, J.E. (1996) Insulin stimulation of a MEK-dependent but ERK-independent SOS protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 577-583.

Hordijk, P.L., ten Klooster, J.P., van der Kammen, R.A., Michiels, F., Oomen, L.C., et Collard, J.G. (1997) Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science* **278**: 1464-1466.

Hoschuetzky, H., Aberle, H., et Kemler, R. (1994)  $\beta$ -Catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.* **127**: 1375-1380.

Hoshi, M., Ohta, K., Gotoh, Y., Mori, A., Murofushi, H., Sakai, H., and Nishida, E. (1992) Mitogen-activated protein kinase-catalysed phosphorylation of microtubules-associated proteins, microtubule-associated protein 2 and microtubule-associated protein 4, induces an alteration in their function. *Eur. J. Biochem.* **203** : 43-52.

Hoshi, T., Garber, S.S., and Aldrich, R.W. (1988) Effect of forskolin on voltage-gated  $K^+$  channels is independent of adenylyl cyclase activation. *Science* **240**: 1652-1655.

Hoshino, R., Chatani, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Oka, H., Yoshida, O., Shimada, Y., Ari-I, S., Wada, H., Fujimoto, J., et Kohno, M. (1999) Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* **18**:813-822.

Houde, M., Laprise, P., Jean, D., Blais, M., Asselin, C., et Rivard, N. (2001) Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *J. Biol. Chem.* **276**: 21885-21894.

Houle, F., Rousseau, S., Morrice, N., Luc, M., Mongrain, S., Turner, C.E., Tanaka, S., Moreau, P., et Huot, J. (2003) Extracellular signal-regulated kinase mediates phosphorylation of tropomyosin-1 promote cytoskeleton remodeling

---

in response to oxidative stress : Impact on membrane blebbing. *Mol. Biol. Cell* **14**: 1418-1432.

Huschtscha, L.I., et Reddel, R.R. (1999) p16INK4A and the control of cellulaire proliferative life span. *Carcinogenesis* **20**: 921-926.

Huttelmaier, S., Mayboroda, O., Harbeck, B., Jarchau, T., Jockusch, B.M., et Rudiger, M. (1998) The interaction of the cell-contact proteins VASP and vinculin is regulated by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Curr. Biol.* **8**: 479-488.

Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A.J., et Kornfeld, K. (1999) Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev.* **13**: 163-175.

James, R., Erler, T., et Kazenwadel, J. (1994) Structure of the murine homeobox gene cdx-2: expression in embryonic and adult intestinal epithelium. *J. Biol. Chem.* **269**: 15229-15237.

Janssen, K.-L., Marjou, F.E., Pinto, D., Sastre, X., Rouillard, D., Fouquet, C., Soussi, T., Louvard, D., et Robine, S. (2002) Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. *Gastroenterology* **123**: 492-504.

Jasleen, J., Shimoda, N., Shen, E.R., Tavakkolizadeh, A., Whang, E.E., Jacobs, D.O., Zinner, M.J., et Ashley, S.W. (2000) Signaling mechanisms of glucagons-like peptide 2-induced intestinal epithelial cell proliferation. *J. Surg. Res.* **90** : 13-18.

Joshi, B., Cai, A.L., Keiper, B.D., Minich, W.B., Mendez, R., Beach, C.M., Stepinski, J., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E., et Rhoads, R.E. (1995) Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at ser209. *J. Biol. Chem.* **270**: 14597-14603.

Kaibuchi, K., Kuroda, S., et Amano, M. (1999) Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 459-486.

Kaiser, G.C., Yan, F., et Polk, D.B. (1999) Conversion of TNF $\alpha$  from antiproliferative to proliferative ligand in mouse intestinal epithelial cells by regulating mitogen-activated protein kinase. *Exp. Cell Res.* **249**: 349-358.

Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G., et Sherr, C.J. (1997) Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* **91**: 649-659.



---

Kamijo, T., Weber, J.D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M.F., et Sherr, C.J. (1998) Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 8292-8297.

Karam, S.M. (1999) Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front. Biosci.* **4**: 286-298.

Karim, F.D., et Rubin, G.M. (1999) PTP-ER, a novel tyrosine phosphatase, functions downstream of Ras1 to downregulate MAP kinase during Drosophila eye development. *Mol. Cell* **3**:741-750.

Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., et Craig, R.W. (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* **51** : 6304-6311.

Kato, J.-Y, Matsuoka, M., Polyak, K., Massagué, J., et Sherr, C.J. (1994) Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27<sup>Kip1</sup>) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* **79** : 487-496.

Kawada, M., Yamagoe, S., Murakami, Y., Suzuki, K., Mizuno, S., et Uehara, Y. (1997) Induction of p27kip1 degradation and anchorage independence by Ras through the MAP kinase signalling pathway. *Oncogene* **15**: 629-637.

Kawamori, T., Uchiya, N., Sugimura, T., et Wakabayashi, K. (2003) Enhancement of colon carcinogenesis by prostaglandin E2 administration. *Carcinogenesis* **24** : 985-990.

Kawasaki, H., Springett, G.M., Mochzuki, N., Toki, N., Nakaya, M., Housmann, D.E., et Graybiel, A.M. (1998) A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **282**: 2275-2279.

Kellet, G.L. (2001) The facilitated component of intestinal glucose absorption. *J. of Physiol.* **531**: 585-595.

Kennelly, P.J., et Krebs, E.G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**: 15555-15558.

Keyse, S.M. (2000) Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 186-192.

Kim-Kaneyama, J., Nose, K., et Shibamura, M. (2000) Significance of nuclear relocalization of ERK1/2 in reactivation of c-fos transcription and DNA synthesis in senescent fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **275**: 20685-20692.

---

King, I.S., Paterson, J.Y., Peacock, M.A., Smith, M.W., et Syme, G. (1983) Effect of diet upon enterocyte differentiation in the rat jejunum. *J. Physiol.* **344**: 465-481.

Kinsella, A.R., Lepts, G.C., Hill, C.L., et Jones, M. (1994) Reduced E-cadherin expression correlates with increased invasiveness in colorectal carcinoma cell lines. *Clin. Exp. Metastasis* **12**:335-342.

Kinter, C. (1992) Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain. *Cell* **69**: 225-236.

Kinzler, K.W., et Vogelstein, B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**: 159-170.

Kiyokawa, H., Kineman, R.D., Manova-Todorova, K.O., Soares, V.C., Hoffman, E.S., Ono, M., Khanam, D., Hayday, A.C., Frohman, L.A., et Koff, A. (1996) Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27<sup>kip1</sup>. *Cell* **85**: 721-732.

Klemke, R.L. Cai, S., Giannini, A.L., Gallagher, P.J., de Lanerolle, P., and Cheresch, D.A. (1997) Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Biol.* **137** : 481-492.

Klinger, C., Kniesel, U., Bamforth, S.D., Wolburg, H., Engelhardt, B., and Risau, W. (2000) Disruption of epithelial tight junctions is prevented by cyclic nucleotide-dependent protein kinase inhibitors. *Histochem. Cell Biol.* **113**: 349-361.

Kodama, A., Takaishi, K., Nakano, K., Nishioka, H., et Takai, Y. (1999) Involvement of Cdc42small G protein in cell-cell adhesion, migration and morphology of MDCK cells. *Oncogene* **18**: 3996-4006.

Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D., et Rapp, U.R. (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* **364**: 249-252.

Kuerbitz, S.J., Plunkett, B.S., Walsh, W.V., et Kastan, M.B. (1992) Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **89**: 7491-7495.

Kuroda, S., Fukata., M., Nakagawa, M., Fuji, K., Nakamura, T., Ookubo, T., Izawa, I., Nagase, T., Nomura, N., Tani, H. *et al.* (1998) Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science* **281**: 832-835.

---

LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A., et Harlow, E. (1997) New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* **11**: 847-862.

Land, H., Parada, L.F., et Weinberg, R.A. (1983) Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* **304**: 596-602.

Langlois, W.J., Sasaoka, T., Saltiel, A.R., et Olefsky, J.M. (1995) Negative feedback regulation and desensitization of insulin- and epidermal growth factor-stimulated p21ras activation. *J. Biol. Chem.* **270**: 25320-25323.

Laprise, P., Chailier, P., Houde, M., Beaulieu, J.-F., Boucher, M.-J., et Rivard, N. (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J. Biol. Chem.* **277**: 8226-8234.

Larue, L., Ohsugi, M., Hirchenhain, J., et Kemler, R. (1994) E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8263-8267.

Larue, L., Antos, C., Butz, S., Huber, O., Delmas, V., Dominis, M., et Kemler, R. (1996) A role for cadherins in tissue formation. *Development* **122**: 3185-3194.

Lavoie, J.N., L'Allemain, G., Brunet, A., Müller, R., et Pouyssegur, J. (1996) Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44 MAPK and negatively by the p38/HOG MAPK pathway. *J. Biol. Chem.* **271**: 20608-20616.

Leemhuis, J., Boutillier, S., Schmidt, G., et Meyer, D.K. (2002) The protein kinase A inhibitor H89 acts on cell morphology by inhibiting Rho kinase. *J. Pharm. Exp. Therap.* **300**: 1000-1007.

Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**: 323-331.

Levine, E., Lee, C.H., Kintner, C., et Gumbiner, B.M. (1994) Selective disruption of E-cadherin function in early *Xenopus* embryos by a dominant negative mutant. *Development* **120**: 901-909.

Levy, G.N. (1997) Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *FASEB J.* **11**: 234-247.

Levy, T., Suh, E., Siang, S., et Traber, P.G. (1995) The intestine-specific homeobox gene *Cdx2* activates intestinal transcription via both promotor and enhancer elements. *Gastroenterology* **108**: A301.

- 
- Li, D., and Mrsny, R.J. (2000) Oncogenic Raf-1 disrupts epithelial tight junctions via down-regulation of occludin. *J. Cell Biol.* **148**: 791-800.
- Li, Y., Jenkins, C.W., Nichols, M.A., et Xiong, Y. (1994) Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* **9** : 2261-2268.
- Li, W., Duzgun, A., Sumpio, B.E., et Basson, M.D. (2001) Integrin and FAK-mediated MAPK activation is required for cyclic strain mitogenic effects in Caco-2 cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**: G75-G87.
- Lin, A.W., Barradas, M., Stone, J.C., Van Aelst, L., Serrano, M., et Lowe, S.W. (1998) Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive active MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.* **12**:3008-3019.
- Lin, L., Wartmann, M., Lin, A., Knopf, J.L., Seth, A., et Davis, R.J. (1993) cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* **72** : 269-278.
- Liu, Y., Martindale, J.L., Gorospe, M., et Holbrook, N.J. (1996) Regulation of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression through mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res.* **56**: 31-35.
- Loda, M., Cukor, B., Tam, S.W., Lavin, P., Fiorentino, M., Draetta, G.F., Jessup, J.M., et Pagano, M. (1997) Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Med.* **3**: 152-154.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L. Matsudaira, P., Baltimore, D., et Darnell, J. (2001) Molecular cell biology. 4e edition. Édition W.H. Freeman and Company, New York, 1084p.
- Lorentz, O., Duluc, I., De Arcangelis, A., Simon-Assmann, P., Kédinger, M., et Freund, J.-N. (1997) Key role of the *Cdx2* homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J. Cell Biol.* **139**: 1553-1565.
- Louvard, D., Kédinger, M., et Hauri, H.P. (1992) The differentiating intestinal epithelial cell: Establishment and maintenance of functions through interactions between cellular structures. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**: 157-195.
- Lundberg, A.S., et Weinberg, R.A. (1998) Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 753-761.

---

Luongo, D., Mazzearella, G., Della Ragione, F., Maurano, F., et Rossi, M. (2002) Down-regulation of ERK1 and ERK2 activity during differentiation of the intestinal cell line HT-29. *Mol. Cell. Biochem.* **231**: 43-50.

Madara, J.L. (1999) Epithelia: Biologic principles of organization. Dans *Textbook of gastroenterology*. (Yamada, T., ed) 3<sup>rd</sup> Ed., pp.141-156, J.B. Lippincott Co., Philadelphia

Makkinje, A., Xiong, H., Li, M., et Damuni, Z. (1995) Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E by insulin-stimulated protamine kinase. *J. Biol. Chem.* **270**: 14824-14838.

Mamajiwalla, S.N., et Burgess, D.R. (1995) Differential regulation of the activity of the 42 kD mitogen activated protein kinase (p42mapk) during enterocyte differentiation *in vivo*. *Oncogene* **11**: 377-386.

Marie, H., Pratt, S.J., Betson, M., Epple, H., Kittler, J.T., Meek, L., Moss, S.J., Troyanovsky, S., Attwell, D., Longmore, G.D., et Braga, V.M. (2003) The LIM protein Ajuba is recruited to cadherin-dependent cell junctions through an association with alpha-catenin. *J. Biol. Chem.* **278**: 1220-1228.

Marshall, C.J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**: 179-185.

Martins, M.J., Hipolito-Reis, C., et Azevedo, I. (2001) Effect of fasting on rat duodenal and jejunal microvilli. *Clin. Nutr.* **20**: 325-331.

McConnell, B. B., Starborg, M., Brookes, S., et Peters, G. (1998) Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Curr. Biol.* **8**: 351-354.

McCrea, P. et Gumbiner, B.M. (1991) Purification of a 92-kDa cytoplasmic protein tightly associated with the cell-cell adhesion molecule E-cadherin (uvomorulin): characterization and extractability of the protein complex from the cell cytostructure. *J. Biol. Chem.* **266**: 4514-4520.

McNeill, H., Ozawa, M., Kemler, R., et Nelson, W.J. (1990) Novel function of the cell adhesion molecule uvorulin as an inducer of cell surface polarity. *Cell* **62**: 309-316.

Meloche, S., Seuwen, K., Pagès, G., et Pouyssegur, J. (1992) Biphasic and synergistic activation of p44 (ERK1) by growth factors : correlation between late phase activation and mitogenicity. *Mol. Endocrinol.* **6**: 845-854.

---

Ménard, D. (1989) Growth-promoting factors and the development of the human gut. Dans *Human Gastrointestinal development*. (Lebenthal, E., ed), pp.123-150, Raven Press, NY

Ménard, D., et Beaulieu, J.-F. (1994) Human intestinal brush border membrane hydrolases. Dans *Membrane physiopathology*. (Bkaily, G., ed), pp.319-341, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA

Meyer, B.I., et Gruss, P. (1993) Mouse *Cdx1* expression during gastrulation. *Development* **117** : 191-203.

Mitic, L.L., Van Itallie, C.M., et Anderson, J.M. (2000) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Tight junction structure and functions: lessons from mutant animals and proteins. *Am. J. Physiol.* **279**: G250-G254.

Moelling, K., Schad, K., Bosse, M., Zimmermann, S., et Schweneker, M. (2002) Regulation of Raf-Akt cross-talk. *J. Biol. Chem.* **277**: 31099-31106.

Montminy, M. (1997) Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 807-822.

Morales, C.P., Holt, S.E., Ouellette, M., Kaur, K.J., Yan, Y., Wilson, K.S., White, M.A., Wright, W.E., et Shay, J.W. (1999) Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat. Genet.* **21**: 155-118.

Morse, L., Chen, D., Franklin, D., Xiong, Y., et Chen-Kian, S. (1997) Induction of cell cycle arrest and B cell terminal differentiation by CDK inhibitor p18 (INK4c) and IL-6. *Immunity*, **6**, 47-56.

Moucadel, V., Totaro, M.S., Dommon-Dell, C., Soubeyran, P., Dagorn, J.-C., Freund, J.-N., et Iovanna, J.L. (2002) The homeobox gene *Cdx1* belongs to the p53-p21<sup>Waf</sup>-Bcl-2 network in intestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **297**: 607-615.

Muller, J., Ory, S., Copeland, T., Piwnicka-Worms, H., et Morrison, D.K. (2001) C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Mol. Cell* **8**: 983-993.

Murphy, L.O., Smith, S., Chen, R.-H., Fingar, D.C., et Blenis, J. (2002) Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nature Cell Biol.* **4**: 556-564.

---

Nagafuchi, A., Schirayoshi, Y., Okazaki, K., Yasuda, K., et Takeichi, M. (1987) Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature (Lond.)* **329**: 340-343.

Nakamura, T., et Gold, G.H. (1987) A cyclin nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* **325**: 442-444.

Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., Loh, D.Y., et Nakayama, K-I. (1996) Mice lacking p27<sup>Kip1</sup> display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* **85**: 707-720.

Nevins, J.R. (1992) E2F : a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* **258** : 424-429.

Newbold, R.F., et Overell, R.W. (1983) Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ c-H-ras oncogene. *Nature* **304**: 648-651.

Nigam, A.K., Savage, F.J., Boulos, P.B., Stamp, G.W., Liu, D., et Pignatelli, M. (1993) Loss of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **68**: 507-514.

Noda, A., Ning, Y., Venable, S.F., Pereira-Smith, O.M., et Smith, J.R. (1994) Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell Res.* **211**: 90-98.

Northwood, I.C., Gonzalez, F.A., Wartmann, M., Raden, D.L., et Davis, R.J. (1991) Isolation and characterization of two growth factor-stimulated protein kinases that phosphorylate the epidermal growth factor receptor at threonine 169. *J. Biol. Chem.* **266**: 15266-15276.

Nourse, J., Firpo, E., Flanagan, W.M., Coats, S., Polyak, K., Lee, M.H., Massagué, J., Crabtree, G., et Roberts, J. M. (1994) Interleukin-2-mediated elimination of p27<sup>Kip1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* **372** : 570-573.

Olson, M.F., Paterson, H.F., et Marshall, C.J. (1998) Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature* **394**: 295-299.

Opleta-Madsen, K., Hardin, J., et Gall, D.G. (1991) Epidermal growth factor upregulates intestinal electrolyte and nutrient transport. *Am. J. Physiol.* **260**: G807-G814.

---

Ostrowski, J., Trzeciak, L., Kolodziejewski, J., et Bomsztyk, K. (1998) Increased constitutive activity of mitogen-activated protein kinase and renaturable 85 kDa kinase in human-colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **78**: 1301-1306.

Otha, Y., Akiyama, T., Nishida, E., and Sakai, H. (1987) Protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase induce opposite effects on actin polymerizability. *FEBS Lett.* **222**: 305-310.

Palmero, I., Pantoja, C., et Serrano, M. (1998) p19<sup>ARF</sup> links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* **395**: 125-126.

Palmqvist, R., Stenling, R., Oberg, A., et Landberg, G. (1998) Expression of cyclin D1 and retinoblastoma protein in colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* **34** : 1575-1581.

Pardee, A.B. (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**: 603-608.

Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.-E., Karandikar, M., Berman, K., et Cobb, M.H. (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocrine Rev.* **22**: 153-183.

Pece, S., et Gutkind, J.S. (2000) Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *J. Biol. Chem.* **275**: 41227-41233.

Perreault, N., et Beaulieu, J.-F. (1996) Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human intestinal epithelial cell cultures. *Exp. Cell. Res.* **224**:354-364.

Petersen, R.K., Jorgensen, C., Rustan, A.C., Froyland, L., Mller-Decker, K., Furstenberger, G., Berge, R.K., Kristiansen, K., and Madsen, L. (2003) Arachidonic acid-dependent inhibition of adipocyte differentiation requires PKA activity and is associated with sustained expression of cyclooxygenases. *J. Lipid Res.* [epub ahead of print]

Pignata, S., Maggini, L., Zarrilli, R., Rea, A., and Acquaviva, A.M. (1994) The enterocyte-like differentiation of the Caco-2 tumor cell line strongly correlates with responsiveness to cAMP and activation of kinase A pathway. *Cell Growth and Diff.* **5**: 967-973.

Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H., et Clevers, H. (2003) Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.* **17**: 1709-1713.



---

Pham, N., Cheglakov, I., Koch, C.A., de Hoog, C.L., Moran, M.F., et Rotin, D. (2000) The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF activates Ras in response to cAMP and cGMP. *Curr. Biol.* **10**: 555-558.

Phelps, D.E., Hsiao, K.-M., Li, Y., Hu, N., Franklin, D.S., Westphal, E., Lee, E.Y.-H.P. et Xiong, Y. (1998a) Coupled transcriptional and translational control of cyclin-dependent kinase inhibitor p18<sup>INK4c</sup> expression during myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 2334-2343.

Phelps, D.E., et Xiong, Y. (1998b) Regulation of cyclin-dependent kinase 4 during adipogenesis involves switching of cyclin D subunits and concurrent binding of p18INK4c and p27Kip1. *Cell Growth Diff.* **9**: 595-610.

Polyak, K., Kato, J., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massagué, J., Roberts, J.M., et Koff, A. (1994) p27<sup>Kip1</sup>, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor- $\beta$  and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* **8**: 9-22.

Polymenis, M., et Schmidt, E.V. (1999) Coordination of cell growth with cell division. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 76-80.

Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C., DePinho, R.A. (1998) The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92** : 713-723.

Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B., et Kinzler, K.W. (1992) APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* **359**: 235-237.

Pyronnet, S., Imataka, H., Gingras, A.C., Fukunaga, R., Hunter, T., et Sonenberg, R. (1999) Human eukaryotic translation factor 4G (eIF4G) recruits Mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J.* **18**: 270-278.

Pyronnet, S., et Sonenberg, N. (2001) Cell-cycle-dependent translational control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**: 13-18.

Quaroni, A., Wands, J., Trelstad, R.L., et Isselbacher, K.J. (1979) Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J. Cell. Biol.* **80**:248-265.

Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A., et Sherr, C.J. (1995) Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* **83**: 993-1000.

---

Quill, H., Weiser, M.M. (1975) Adenylate and guanylate cyclase activities and cellular differentiation in rat small intestine. *Gastroenterology* **69**: 470-478.

Quinlan, M.P., et Hyatt, J.L. (1999) Establishment of the circumferential actin filament network is a prerequisite for localization of the cadherin-catenin complex in epithelial cells. *Cell Growth Differ.* **10**:839-854.

Radfar, A., Unnikrishnan, I., Han-Woong, L., DePinho, R.A., et Rosenberg, N. (1998) p19<sup>Arf</sup> induces p53-dependent apoptosis during Abelson virus-mediated pre-B cell transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 13194-13199.

Rau, M.T., Ohlmann, T., Morley, S.J., et Pain, V.M. (1996) A reevaluation of the cap-binding protein, eIF4E, as a rate-limiting factor for initiation of translation in reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* **271**: 8983-8990.

Redwood, C.S., Marston, S.B., and Gusev N.B. (1993) The functional effects of mutation Thr673→Asp and Ser702→Asp at the Pro-directed kinase phosphorylation sites in the c-terminus of chicken gizzard caldesmon. *FEBS Letters* **327** : 85-89.

Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A., et Massague, J. (1995) Kip/Cip and Ink4 cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev.* **9** : 1831-1845.

Reznikoff, C.A., Yeager, T.R., Belair, C.D., Savelieva, E., Puthenveetil, J.A., et Stadler, W.M. (1996) Elevated p16 at senescence and loss of p16 at immortalization in human papillomavirus 16 E6, but not E7, transformed human uroepithelial cells. *Cancer Res.* **56** : 2886-2890.

Rieker, J.P., et Collins, J.H. (1987) Phosphorylation of brush border myosin by brush border calmodulin-dependent myosin heavy and light chain kinases. *FEBS Letters* **223**: 262-266.

Richards, J.S. (2001) New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol. Endocrinol.* **15**: 209-218.

Rivard, N., L'Allemain, G., Bartek, J., et Pouyssegur, J. (1996) Abrogation of p27<sup>Kip1</sup> by cDNA antisense suppresses quiescence (G0 state) in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **271**: 18337-18341.

Rivard, N., Boucher, M.-J., Asselin, C., et L'Allemain, G. (1999) MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell physiol.* **277**: C652-C664.

---

Roberts, E.C., Shapiro, P.S., Nahreini, T.S., Pagès, G., Pouysségur, J., et Ahn, N.G. (2002) Distinct cell cycle timing requirements for extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase signaling pathways in somatic cell mitosis. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 7226-7241.

Robinson, M.J., Stippec, S.A., Goldsmith, E., White, M.A., et Cobb, M.H. (1998) A constitutively active and nuclear form of the MAP kinase ERK2 is sufficient for neurite outgrowth and cell transformation. *Curr. Biol.* **8**: 1141-1150.

Robinson-White, A., et Stratakis, C.A. (2002) Protein kinase A signaling: "cross-talk" with other pathways in endocrine cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **968**: 256-270.

Robles, S.J., et Adami, G.R. (1998) Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16<sup>INK4a</sup> enrichment and the premature senescence in normal fibroblasts. *Oncogene* **16**: 1113-1123.

Rochette-Egly, C., et Haffen, K. (1987) Developmental pattern of calmodulin-binding proteins in rat jejunal epithelial cells. *Differentiation* **35**: 219-227.

Rogan, E.M., Bryan, T.M., Hukku, B., Maclean, K., Chang, A.C.-M., Moy, E.L., Englezou, A., Warneford, S.G., Dalla-Pozza, L., et Reddel, R.R. (1996) Alterations in p53 and p16<sup>INK4</sup> expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* **15**: 4745-4753.

Roh, M.H., et Margolis, B. (2003) Composition and function of PDK protein complexes during cell polarization. *Am. J. Physiol.* **285**: F377-F387.

Rousset, M., Laburthe, M., Pinto, M., Chevalier, G., Rouyer-Fessard, C., Dussaulx, E., Trugnan, G., Boige, N., Brun, J.-L., and Zweibaum, A. (1985) Enterocytic differentiation and glucose utilization in the human colon tumor cell line Caco-2 : modulation by forskolin. *J. Cell. Physiol.* **123**: 377-385.

Rousset, M., Chantret, I., Darmoul, D., Trugnan, G., Sapin, C., Green, F., Swallow, D., and Zweibaum, A. (1989) Reversible forskolin-induced impairment of sucrase-isomaltase mRNA levels, biosynthesis, and transport to the brush border membrane in Caco-2 cells. *J. Cell. Physiol.* **141**: 627-635.

Rubin, D.C. (1999) Small intestine: Anatomy and structural anomalies. Dans *Textbook of gastroenterology*. (Yamada, T., ed) 3<sup>rd</sup> Ed., pp.1561-1579, J.B. Lippincott Co., Philadelphia

Ruley, H.E. (1990) Transforming collaborations between ras and nuclear oncogenes. *Cancer cells* **2**: 258-268.

---

Saha, C., Nigam, S.K., et Denker, B.M. (1998) Involvement of  $G\alpha_{i2}$  in the maintenance and biogenesis of epithelial cell tight junction. *J. Biol. Chem.* **273**: 21629-21633.

Sahai, E., et Marshall, C.J. (2002) ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nature Cell Biol.* **4**: 408-415.

Sahl, B., Bergman, D., Marotta, A., et Pelech, S.L. (1999) Differential cyclin-dependent kinase expression and activation in human colon cancer. *Anticancer Res.* **19**: 741-748.

Samuels, M.L., et McMahon, M. (1994) Inhibition of platelet-derived growth factor- and epidermal growth factor-mediated mitogenesis and signaling in 3T3 cells expressing delta Raf-1 :ER, an estradiol-regulated form of Raf-1. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 7855-7866.

Sanchez-Cespedes, M., Reed, A.L., Buta, M., Wu, L., Westra, W.H., Herman, J.G., Yang, S.C., Jen, J., et Sidransky, D. (1999) Inactivation of the INK4A/ARF locus frequently coexists with TP53 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene* **18**: 5843-5849.

Sandhue, C., Garbe, J., Bhattacharya, N., Daksis, J., Pan, C.-H., Yasmen, P., Koh, J., Slingerland, J.M., et Stampfer, M.R. (1997) Transforming growth factor  $\beta$  stabilizes p15<sup>INK4B</sup> protein, increased p15<sup>INK4B</sup>-cdk4 complexes, and inhibits cyclin D1-cdk4 association in human mammary epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 2458-2467.

Sangfelt, O., Erickson, S., Einhorn, S., et Grander, D. (1997) Induction of Cip/Kip and Ink4 cyclin dependent kinase inhibitors by interferon-alpha in hematopoietic cell lines. *Oncogene*, **14**, 415-423.

Sapin, C., Baricault, L., and Trugnan, G. (1997) PKC-dependent long-term effect of PMA on protein cell surface expression in Caco-2 cells. *Exp. Cell Res.* **231**: 308-318.

Sausville, E.A. (2002) Complexities in the development of cyclin-dependent kinase inhibitor drugs. *Trends Mol. Med.* **8**: S32-S37.

Saxon, M.L., Zhao, X., et Black, J.D. (1994) Activation of protein kinase C isozymes is associated with post-mitotic events in intestinal epithelial cells in situ. *J. Cell Biol.* **126**: 747-763.

Schaeffer, H.J., Catling, A.D., Eblen, S.T., Collier, L.S., Krauss, A., et Weber, M.J. (1998) MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* **281**: 1668-1671.

---

Schaeffer, H.J., et Weber, M.J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: Specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 2435-2444.

Schönwasser, D.C., Marais, R.M., Marshall, C.J., et Parker, P.J. (1998) Activation of the Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 790-798.

Schrantz, N., Beney, G.E., Auffredou, M.T., Bourgeade, M.F., Leca, G., et Vazquez, A. (2000) The expression of p18<sup>INK4</sup> and p27<sup>kip1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitors is regulated differently during human B cell differentiation. *J. Immuno.* **165**: 4346-4352.

Schreider, C., Peignon, G., Thenet, S., Chambaz, J. et Pinçon-Raymond, M. (2001) Integrin-mediated functional polarization of Caco-2 cells through E-cadherin-actin complexes. *J. Cell Sci.* **115**: 543-552.

Seamon, K.D., and Daly, J.W. (1986) Forskolin: its biological and chemical properties. *Adv. Cyclic Nucl. Prot., Phosphoryl. Res.* **20**: 1-150.

Sebolt-Leopold JS, Dudley DT, Herrera R, Van Becelaere K, Wiland A, Gowan RC, Teclé H, Barrett SD, Bridges A, Przybranowski S, Leopold WR, and Saltiel AR. (1999) Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nature Med* **5**:810-816.

Serrano, M., Lee, H.-W., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D., et DePinho, R.A. (1996) Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* **85**: 27-37.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., et Lowe, S.W. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16<sup>INK4a</sup>. *Cell* **88**: 593-602.

Serres, M., Filhol, O., Lickert, H., Grangeasse, C., Chambaz, E.M., Stappert, J., Vincent, C., et Schmitt, D. (2000) The disruption of adherens junctions is associated with a decrease of E-cadherin phosphorylation by protein kinase CK2. *Exp. Cell Res.* **257**: 255-264.

Sewing, A., Wiseman, B., Lloyd, A.D., et Land, H. (1997) High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21<sup>Cip1</sup>. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 5588-5597.

Sharpless, N.E., et DePinho, R.A. (1999) The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**: 22-30.

---

Shay, J.W., Pereira-Smith, O.M., et Wright, W.E. (1991a) A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp. Cell Res.* **196**: 33-39.

Shay, J.W., Wright, W.E., et Werbin, H. (1991b) Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochim. Biophys. Acta* **1072**: 1-7.

Sherr, C.J. (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**: 1059-1065.

Sherr, C.J. (1994) G1 phase progression : cycling on cue. *Cell* **79**: 551-555.

Sherr, C.J., et Roberts, J.M. (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **9**: 1149-1163.

Sherr, C.J. (1996) Cancer cell cycles. *Science* **274**: 1672-1677.

Shimoyama, Y., Nagafuchi, A., Fujita, S., Gotoh, M., Takeichi, M., Tsukita, S., et Hirohashi, S. (1992) Cadherin dysfunction in a human cancer cell line: possible involvement of loss of  $\alpha$ -catenin expression in reduced cell-cell adhesiveness. *Cancer Res.* **52**: 5770-5774.

Shore, E.M., et Nelson, W.J. (1991) Biosynthesis of the cell adhesion molecule uvomorulin (E-cadherin) in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **266**: 19672-19680.

Skalhegg, B.S., and Tasken, K. (2000) Specificity in the cAMP/PKA signalling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front. Biosci.* **5**: d678-693.

Smolenski, A., Bachmann, C., Reinhard, K., Honig-Liedl, P., Jarchau, T., Hoschuetzky, H., et Walter, U. (1998) Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* **273**:20029-20035.

Songyang, Z., Lu, K.P., Kwon, Y.T., Tsai, L., Filhol, O., Cochet, C., Brickey, D.A., Soderling, T.R., Bartleson, C., Graves, D.J., DeMaggio, A.J., Hoekstra, M.F., Blenis, J., Hunter, T., et Cantley, L.C. (1996) A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: Primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 6486-6493.

Sonoshita, M., Takaku, K., Sasaki, N., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., Narumiya, S., Oshima, M., et Taketo, M.M. (2001) Acceleration of intestinal polyposis

---

through prostaglandin receptor EP2 in APC(delta716) knockout mice. *Nature Med.* **7**: 1048-1051.

Soubeyran, P., André, F., Lissitzky, J.-C., Mallo, G.V., Moucadel, V., Roccabianca, M., Rechreche, H., Marvaldi, J., Dikic, I., Dagorn, J.-C., et Iovanna, J.L. (1999) Cdx1 promotes differentiation in a rat intestinal epithelial cell line. *Gastroenterology* **117**: 1326-1338.

Stappenbeck, T.S., et Gordon, J.I. (2000) Rac1 mutations produce aberrant epithelial differentiation in the developing and adult mouse small intestine. *Development* **127**: 2629-2642.

Stappenbeck, T.S., Wong, M.H., Saam, J.R., Mysorekar, I.U., et Gordon, J.I. (1998) Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 702-709.

Stappert, J., et Kemler, R. (1994) A short core region of E-cadherin is essential for catenin binding and is highly phosphorylated. *Cell Adh. Com.* **2**: 319-327.

Stein, G.H., et Dulic, V. (1995) Origins of G1 arrest in senescent human fibroblasts. *Bioessays* **17**: 537-543.

Steinberg, M.S., et Takeichi, M. (1994) Experimental specification of cell-sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 206-209.

Stofega, M.R., Yu, C.L., Wu, J., et Jove, R. (1997) Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) by mitogenic stimuli is repressed in v-Src-transformed cells. *Cell Growth Differ.* **8**: 113-119.

Stork, P.J.S., et Schmitt, J.M. (2002) Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* **12**: 258-166.

Stott, F.J., Bates, S., James, M.C., McConnell, B.B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K.H., et Peters, G. (1998) The alternative product from the human *CDKN2A* locus, p14<sup>ARF</sup>, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J.* **17**: 5001-5014.

Suh, E., Chen, L., Taylor, J., et Traber, P.G. (1994) A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 7340-7351.

Suh, E., et Traber, P.G. (1996) An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 619-625.

---

Sutor, S.L., Vroman, B.T., Armstrong, E.A., Abraham, R.T., et Kranitz, L.M. (1999) A phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway that differentially regulates c-Raf and A-Raf. *J. Biol. Chem.* **274**: 7002-7010.

Suzuki, K., Mori, I., Nakayama, Y., Miyakoda, M., Kodama, S., et Watanabe, M. (2001) Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomerase shortening. *Rad. Res.* **155**: 248-253.

Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., et Nishida, E. (2000) A conserved docking motif common to substrates, activators and regulators. *Nature Cell Biol.* **2**: 110-116.

Takahashi, K., Nakayama, K., et Nakayama, K. (2000) Mice lacking a CDK inhibitor, p57Kip2, exhibit skeletal abnormalities and growth retardation. *J. Biochem.* **127**: 73-83.

Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H., et Takai, Y. (1997) Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **139**: 1047-1059.

Takeichi, M. (1993) Cadherins in cancer: implication for invasion and metastasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**: 806-811.

Tanaka, N., Ishihara, M., Kitagawa, M., Harada, H., Kimura, T., Matsuyama, T., Lamphier, M.S., Aizawa, S., Mak, T.W., et Taniguchi, T. (1994) Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1. *Cell* **77**: 829-839.

Taupin, D., et Podolsky, D.K. (1999) Mitogen-activated protein kinase activation regulates intestinal epithelial differentiation. *Gastroenterology* **116**: 1072-1080.

Tepass, U. (2002) Adherens junctions: new insight into assembly, modulation and function. *Bioessays* **24**: 690-695.

Thomas, G.V., Szigeti, K., Murphy, M., Draetta, G., Pagano, M., et Loda, M. (1998) Down-regulation of p27 is associated with development of colorectal adenocarcinoma metastases. *Am. J. Pathol.* **153**: 681-687.

Tohgo, A., Pierce, K.L., Choy, E.W., Lefkowitz, R.J., et Luttrell, L.M. (2002) Beta-arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J. Biol. Chem.* **277**: 9429-9436.



---

Treisman, R. (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**: 205-215.

Turner, J.R., Angle, J.M., Black, E.D., Joyal, J.L., Sacks, D.B., and Madara, J.L. (1999) PKC-dependent regulation of transepithelial resistance: role of MLC and MLC kinase. *Am. J. Physiol.* **277**: C554-C562.

Ueki, K., Matsuda, S., Tobe, K., Gotoh, Y., Tamemoto, H., Yachi, M., Akanuma, Y., Yazaki, Y., Nishida, E., et Kadowaki, T. (1994) Feedback regulation of mitogen-activated protein kinasekinasekinase activity of c-Raf-1 by insulin and phorbol ester stimulation. *J. Biol. Chem.* **269**: 15756-15761.

Van Delft, S., Verkleij, A.J., Buonstra, J., van Bergen, P.M.P., et Henegouwen, E.N. (1995) Epidermal growth factor induces serine phosphorylation of actin. *FEBS Lett.* **357**: 251-254.

Van Itallie, C.M., et Anderson, J.M. (1997) Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. *J. Cell Sci.* **110**: 1113-1121.

Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M., et Fuchs, E. (2000) Directed actin polymerization is the driving force epithelial cell-cell adhesion. *Cell* **100**: 209-219.

Vasioukhin, V., et Fuchs, E. (2001) Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 76-84.

Vaudry, D., Stork, P.J., Lazarovici, P., and Eiden, L.E. (2002) Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science* **296**: 1648-1649.

Voice, J.K., Klemke, R.L., Le, A., et Jackson, J.H. (1999) Four human Ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J. Biol. Chem.* **274**: 17164-17170.

Volberg, T., Geiger, B., Kartenbeck, J., et Franke, W.W. (1986) Changes in membrane-microfilament interaction in intercellular adherens junctions upon removal of extracellular Ca<sup>2+</sup> ions. *J. Cell Biol.* **102**: 1832-1842.

Volmat, V., Camps, M., Arkinstall, S., Pouyssegur, J., et Lenormand, P. (2001) The nucleus, a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases. *J. Cell Sci.* **114**: 3433-3443.

Vouret-Craviari, V., Van Obberghen Scilling, E., Scimeca, J.-C., Van Obberghen, E., et Pouyssegur, J. (1993) Differential activation of p44 MAPK (ERK1) by  $\alpha$ -thrombin and thrombin receptor peptide agonist. *Biochem. J.* **289**: 209-214.

---

Warn-Cramer, B.J., Cottrell, G.T., Burt, J.M., and Lau, A.F. (1998) Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273** : 9188-9196.

Waskiewick, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., et Cooper, J.A. (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J.* **16**: 1909-1920.

Watabe, M., Nagafuchi, A., Tsukita, S., et Takeichi, M. (1994) Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line. *J. Cell Biol.* **127**: 247-256.

Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Imamura, Y., Nagafuchi, A., Fujimoto, K., Uemura, T., Vermeulen, S., van Roy, F., Adamson, E.D., et Takeichi, M. (1998)  $\alpha$ -Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J. Cell Biol.* **142**: 847-857.

Waters, S.B., Yamauchi, K., et Pessin, J.E. (1995) Insulin-stimulated dissociation of the Sos-Grb2 complex. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 2791-2799.

Weber, J.D., Raben, D.M., Phillips, P.J., et Baldassare, J.J. (1997) Sustained activation of extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochem. J.* **326**: 61-68.

Weinberg, R.A. (1989) Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* **49**: 3713-3721.

Weinberg, R.A. (1997) The cat and mouse games that genes, viruses, and cells play. *Cell* **88**: 573-575.

Welsh, C.F., Roovers, K., Villanueva, J., Liu, Y., Schwartz, M.A. et Assoian, R.K. (2001) Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat. Cell Biol.* **3**: 950-957.

Whelan, M.C., et Senger, D.R. (2003) Collagen I initiates endothelial cell morphogenesis by inducing actin polymerization through suppression of cyclic AMP and protein kinase A. *J. Biol. Chem.* **278**: 327-334.

Whittard, J.D., et Akiyama, S.K. (2001a) Positive regulation of cell-cell and cell-substrate adhesion by protein kinase A. *J. Cell Sci.* **114**: 3265-3272.

Whittard, J.D., et Akiyama, S.K. (2001b) Activation of  $\beta$ 1 integrins induces cell-cell adhesion. *Exp. Cell Res.* **263**: 65-76.

---

Woods, D., Parry, D., Cherwinski, H., Bosch, E., Lees, E., et McMahon, M. (1997) Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21<sup>Cip1</sup>. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 5598-5611.

Wright, J.H., Munar, E., Jameson, D.R., Andreassen, P.R., Margolis, R.L., Seger, R., et Krebs, E.G. (1999) Mitogen-activated protein kinase kinase activity is required for the G2/M transition of the cell cycle in mammalian fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 11335-11340.

Wright, W.E., et Shay, J.W. (1992) The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp. Gerontol.* **27**: 383-389.

Wu, J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, M.J., et Sturgill, T.W. (1993) Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* **262** : 1065-1069.

Wu, H., et Montone, K.T. (1998) Cortactin localization in actin-containing adult and fetal tissues. *J Histochem. Cytochem.* **46**: 1189-1191.

Yan, Y., Frisén, J., Lee, M.H., Massagué, J., et Barbacid, M. (1997) Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. *Genes Dev.* **11**: 973-983.

Young, S.P., Parker, P.J., Ullrich, A., et Stabel, S. (1987) Down-regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation. *Biochem. J.* **244**: 775-779.

Yung, Y., Yao, Z., Hanoch, T., et Seger, R. (2000) ERK1b, a 46-kDa ERK isoform that is differentially regulated by MEK. *J. Biol. Chem.* **275**:15799-15808.

Yung, Y., Yao, Z., Aebersold, D.M., Hanoch, T., et Seger, R. (2001) Altered regulation of ERK1b by MEK1 and PTP-SL and modified Elk1 phosphorylation by ERK1b are caused by abrogation of the regulatory C-terminal sequence of ERKs. *J. Biol. Chem.* **276**:35280-35289.

Zarkowska, T., et Mitnacht, S. (1997) Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. *J. Biol. Chem.* **272**: 12738-12746.

Zhang, H., Hannon, G.J., et Beach, D. (1994) p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev.* **8** : 1750-1758.

Zhang, J., Zhang, F., Ebert, D., Cobb, M.H., et Goldsmith, E.J. (1995) Activity of the MAP kinase ERK2 is controlled by a flexible surface loop. *Structure* **3**: 299-307.

---

Zhang, P., Liégois, N.J., Wong, C., Finegold, M., Hou, H., Thompson, J.C., Silverman, A., Harper, J.W., DePinho, R.A., et Elledge, S.J. (1997a) Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* **387**: 151-158.

Zhang, T., Nanney, L.B., Luongo, C., Lamps, L., Heppner, K.J., DuBois, R.N., et Beauchamp, R.D. (1997b) Concurrent overexpression of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4) in intestinal adenomas from multiple intestinal neoplasia (Min) mice and human familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res.* **57**: 169-175.

Zhang, Y., Xiong, Y et Yarbrough, W.G. (1998) ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53 : ARF-INK4a locus deletion impairs both th Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* **92** : 725-734.

Zhu, J., Woods, D., McMahon, M., et Bishop, J.M. (1998) Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.* **12**: 2997-3007.

Zimmermann, S., et Moelling, K. (1999) Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (Protein kinase B). *Nature* **286**: 1741-1744.

Zindy, F., Soares, H., Herzog, K.H., Morgan, J., Sherr, C.J., et Roussel, M.F. (1997a) Expression of INK4 inhibitors of cyclin D-dependent kinases during mouse brain development. *Cell Growth Diff.* **8**: 1139-1150.

Zindy, F., Quelle, D.E., Roussel, M.F., et Sherr, C.J. (1997b) Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* **15**: 203-211.

Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., et Roussel, M.F. (1998) Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* **12**: 2424-2433.